

Untersuchungen zur Virulenzassoziation des Flagellenregulons von *Legionella pneumophila*

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Tino Schulz

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter/in:

1. PD Dr. Klaus Heuner, Robert Koch-Institut, Berlin
2. Prof. Dr. Antje Flieger, Robert Koch-Institut, Berlin
3. Prof. Dr. Thomas Eitinger, Humboldt-Universität zu Berlin

Datum der Einreichung: 03. April 2012

Datum der Promotion: 29. August 2012

Für Luna und Eva

„Die Ewigkeit dauert lange, besonders gegen Ende.“

Woody Allen

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
SUMMARY.....	4
1. EINLEITUNG.....	7
1.1 Der Genus <i>Legionella</i>	8
1.2 Biologie und Habitate von <i>Legionella pneumophila</i>	8
1.2.1 Biologie von <i>L. pneumophila</i>	8
1.2.2 <i>Legionella</i> im natürlichen Habitat	9
1.2.3 <i>Legionella</i> in künstlichen Habitaten	9
1.3 Legionellose: Entdeckung, Erkrankung, Diagnostik, Therapie und Epidemiologie	10
1.3.1 Die Entdeckung eines neuen Erregers zweier Krankheitsbilder	10
1.3.2 Legionellose: Pontiac-Fieber und Legionärskrankheit	11
1.3.3 Diagnostik und Therapie	11
1.3.4 Epidemiologie von <i>Legionella</i> spp.	14
1.4 Diversität innerhalb der Genome verschiedener <i>L. pneumophila</i> Stämme	15
1.4.1 Genomische und Pathogenitätsinseln von <i>Legionella</i>	16
1.4.2 Plasmide in <i>Legionella</i>	17
1.5 Der intrazelluläre Lebenszyklus von <i>L. pneumophila</i>	18
1.5.1 Der Infektionszyklus in Wirtszellen	18
1.5.2 Charakterisierung der replikativen und der transmissiven Phase	20
1.5.3 Die MIF-Form von <i>Legionella</i>	22
1.5.4 Regulation des Lebenszyklus von <i>L. pneumophila</i>	23
1.6 Proteinsekretionssysteme von <i>L. pneumophila</i>	26
1.6.1 Überblick über die Sekretionssysteme	26
1.6.2 Das Typ III Sekretionssystem.....	27
1.7 Virulenzfaktoren von <i>L. pneumophila</i>	29
1.7.1 Virulenzfaktoren auf der Oberfläche von <i>Legionella</i>	29
1.7.2 Sekretierte Virulenzfaktoren von <i>Legionella</i>	30
1.8 Das bakterielle Chemotaxisssystem	31
1.9 Der bakterielle Flagellenapparat	32
1.9.1 Die evolutionäre Entstehung des Flagellenapparates	33
1.9.2 Die Funktionen der Flagelle	34
1.9.3 Der strukturelle Aufbau der Flagelle	35
1.9.4 Der regulierte Zusammenbau der Flagelle	36
1.10 Die Expression der Flagelle in <i>L. pneumophila</i>	38
1.10.1 Die Gene und Proteine der Flagelle	38
1.10.2 Die Regulation der Flagellenexpression.....	39
1.10.3 Der kaskadenartige Aufbau des Flagellenregulons	39
1.10.4 Die Flagelle und Virulenz.....	43
1.10.5 Die Flagelle in tierischen und humanen Wirtszellen	44
1.11 Ziele der Arbeit.....	47
2. MATERIAL	48

2.1 Bakterienstämme	49
2.2 Amöben	50
2.3 Vektorkarte pGEM TEasy	51
2.4 Plasmide	52
2.5 Oligonukleotide	53
2.6 Chemikalien.....	55
2.7 DNA- und Protein-Größenstandards	56
2.7.1 DNA-Größenstandards.....	56
2.7.2 Protein-Größenstandards	56
2.8 Antibiotika und Medienzusätze	57
2.9 Antikörper	58
2.10 Enzyme.....	59
2.11 Verwendete Kits	59
2.12 Geräte.....	60
3. METHODEN	62
3.1 Kultivierungstechniken.....	63
3.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	63
3.1.2 Kultivierung von verschiedenen <i>Legionella</i> -Stämmen	64
3.1.3 Kultivierung von <i>Acanthamoeba castellanii</i>	65
3.1.4 Konservierung von Bakterien.....	66
3.2 Nukleinsäure-Techniken	67
3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA	67
3.2.2 Isolation von chromosomaler DNA	67
3.2.3 Isolation von Plasmid-DNA	68
3.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion	69
3.2.5 DNA Fällung	69
3.2.6 Restriktionsverdau.....	69
3.2.7 <i>DpnI</i> Verdau	70
3.2.8 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA	71
3.2.9 Klenow-Reaktion	71
3.2.10 Religation	72
3.2.11 Ligation von DNA mit dem <i>pGEM TEasy Ligation Kit</i>	73
3.2.12 Ligation von DNA mit T4 Ligase.....	73
3.2.13 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	74
3.2.14 Herstellung elektrokompetenter <i>L. pneumophila</i> Zellen	74
3.2.15 Transformation durch Elektroporation	75
3.2.16 Natürliche Transformation von <i>L. pneumophila</i>	75
3.2.17 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	76
3.2.18 Inverse PCR	79
3.2.19 PCR mit ganzen Bakterien („Aufkoch-PCR“)	80
3.2.20 Sequenzierungs-PCR.....	80
3.2.21 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR).....	82
3.2.22 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	83
3.2.23 Gelelution von DNA-Fragmenten durch Kälte-Phenol-Extraktion	84
3.2.24 Bestimmung des Transkriptionsstarts eines Gens (5'-RACE Methode)	85
3.2.25 Herstellung von Mutanten.....	86

3.3 Proteinchemische Techniken	87
3.3.1 Präadsorption von Antikörpern	87
3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	88
3.3.3 Western Blot (<i>semi-dry</i> -Verfahren)	90
3.3.4 <i>Stripping</i> von Nitrozellulose-Membranen	91
3.3.5 Detektion von Antikörpern mittels ECL-Reaktion	92
3.3.6 Detektion von Antikörpern mittels Farbreaktion	92
3.4 In vivo Experimente	93
3.4.1 Infektion von <i>A. castellanii</i>	93
3.4.2 Re-Infektion von <i>A. castellanii</i> über vier Infektionszyklen	95
3.4.3 Ko-Infektion von <i>A. castellanii</i> mit zwei Bakterienstämmen	96
3.5 Elektronenmikroskopie	97
3.5.1 Anzucht der Bakterien	97
3.5.2 Fixierung und Untersuchung mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	97
3.5.3 Immunogold-Markierung des Flagellenapparates	98
3.6 In silico Auswertung verschiedener Genomsequenzen	99
3.6.1 Präparation und Sequenzierung von genomischer DNA verschiedener <i>Legionella</i> Stämme	99
3.6.2 <i>In silico</i> Analyse von Genomsequenzen	99
4. ERGEBNISSE.....	101
4.1 Generierung von spezifischen knock-out Mutanten in <i>L. pneumophila</i> Corby	102
4.1.1 Herstellung einer $\Delta lpc2402$ knock-out Mutante in <i>L. pneumophila</i> Corby	102
4.1.2 Herstellung einer $\Delta fliD$ knock-out Mutante in <i>L. pneumophila</i> Corby	109
4.2 Phänotypische Analyse von <i>L. pneumophila</i>	111
4.2.1 Wachstum von <i>L. pneumophila</i> <i>in vitro</i>	112
4.2.2 Wachstum von <i>L. pneumophila</i> <i>in vivo</i>	113
4.2.3 Konkurrierendes Wachstum in <i>A. castellanii</i>	116
4.3 Das Flagellen-Regulon - Transkriptionelle und translationelle Untersuchungen von <i>Lp</i> Corby	121
4.3.1 Expression von <i>rpoN</i>	123
4.3.2 Expression von <i>fleQ</i> und Vorkommen von FleQ	123
4.3.3 Expression des alternativen σ^{28} Faktors <i>fliA</i> und Vorkommen von FliA	123
4.3.4 Expression von <i>flaA</i> und Vorkommen von Flagellin (FlaA)	124
4.3.5 Expression von <i>fleR</i>	124
4.3.6 Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von <i>flhF</i> , <i>fleN</i> und <i>fliA</i>	125
4.3.7 Einfluss des alternativen σ^{28} Faktors FliA auf <i>lpc2402</i>	135
4.3.8 <i>In silico</i> Promotoranalysen	137
4.3.8.1 Promoteranalyse von <i>fleQ</i>	138
4.3.8.2 Promoteranalyse von <i>fleS</i>	140
4.3.8.3 Promoteranalyse von <i>fliM</i>	142
4.3.8.4 Promoteranalyse von <i>flhF</i>	144
4.3.8.5 Promoteranalyse von <i>fliA</i>	145
4.3.8.6 Promoteranalyse von <i>flaA</i>	147
4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Flagelle	149
4.5 Der Aufbau des Flagellen-Regulons von <i>Legionella</i> – Eine <i>In silico</i> Analyse	153
4.5.1 Verschiedene <i>Legionella</i> Stämme	153
4.5.2 Genotypische Untersuchung verschiedener <i>Legionella</i> Stämme	155
4.5.2.1 <i>Legionella pneumophila</i> Corby als Referenzstamm	164
4.5.2.2 <i>Legionella longbeachae</i> NSW150 – ein Chemotaxissystem ohne Flagelle	165
4.5.2.3 Weitere <i>L. pneumophila</i> Stämme	166
4.5.2.4 <i>Legionella pneumophila</i> Togus-1	167
4.5.2.5 <i>Legionella-like amoebal pathogen</i> 10 - LLAP10 – <i>Legionella fallonii</i>	168
4.5.2.6 <i>Legionella-like amoebal pathogen</i> 12 - LLAP12 - <i>Legionella drancourtii</i>	168

4.5.2.7	<i>Legionella micdadei</i>	169
4.5.2.8	<i>Legionella hackelia</i>	170
4.5.2.9	<i>Legionella bozemanii</i>	171
4.5.2.10	<i>Legionella gormanii</i>	171
4.5.2.11	<i>Legionella lytica</i>	172
4.5.2.12	<i>Legionella oakridgensis</i>	172
4.5.2.13	Genomweite Unterschiede zwischen den Stämmen	173
4.5.3	Phänotypische Untersuchung verschiedener <i>Legionella</i> Stämme mittels Elektronenmikroskopie 174	
4.5.4	Vergleichende Untersuchungen zur Verwandtschaft verschiedener <i>Legionella</i> Stämme	177
4.5.4.1	Flagellen-Regulon	178
4.5.4.2	Chemotaxis-Operon	179
4.5.4.3	Mip (macrophage infectivity potentiator)	180
4.5.4.4	Der alternative σ^{28} Faktor FliA	182
4.5.4.5	FliM – ein Bestandteil des Basalkörpers	183
5.	DISKUSSION	186
5.1	Das Flagellenregulon und seine Virulenzassoziation	187
5.2	Genexpression des Flagellenregulons	189
5.3	Die Expression des alternativen σ^{28} Faktors <i>fliA</i>	191
5.4	Der strukturelle Aufbau des Flagellenapparats	193
5.5	Evolutionäre Veränderungen von <i>Legionella</i> auf Genomebene	194
5.6	Ein putatives Chemotaxissystem	200
5.7	Evolutionäre Verwandtschaft zwischen verschiedenen <i>Legionella</i> Spezies	204
5.8	Ausblick	207
	LITERATURVERZEICHNIS	208
	ANHANG	236
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	247
	DANKSAGUNG	252
	ERKLÄRUNG	253

Zusammenfassung

Die Flagelle ist ein hoch komplexes und konserviertes Organell und ein entscheidender Virulenz- und Fitnessfaktor von *Legionella pneumophila* (*Lp*), da sie im extrazellulären Stadium der Bakterien das Auffinden von Wirtszellen zur Replikation ermöglicht. Während des Übergangs in die transmissive Phase wird die Flagelle zusammen mit vielen weiteren Virulenzfaktoren exprimiert.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Analyse von Faktoren, die den Zusammenbau des Flagellenapparates regulieren. Dazu wurde zunächst ein kombinierter Replikations-/Überlebensversuch mit *Lp Corby* oder *Lp Paris* und ihren zugehörigen Regulationsmutanten durchgeführt. Dieser Versuch ermöglichte das Detektieren der Gesamtheit kleinster Unterschiede zwischen den Stämmen, wie zum Beispiel in der Adhäsion, Aufnahme und Replikation, dem extrazellulären Überleben in der virulenten Phase und die Fähigkeit zur Reinfektion von *Acanthamoeba castellanii*. So wurde eine verminderte Fitness für $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$ und $\Delta fliA$ defiziente Stämme nachgewiesen, wobei der Effekt für *Lp Paris* stets deutlicher als bei Infektionen mit *Lp Corby* Stämmen war. Für die Regulatoren RpoN und FleQ konnte erstmals eine entscheidende Rolle für die Fitness gezeigt werden.

Bereits publizierte Microarray-Daten aus *Lp Paris* zeigten, dass FleQ, RpoN und FliA die wichtigsten Regulatoren beim Aufbau des Flagellenapparates sind. Um diese Daten zu validieren und die Übertragbarkeit auf den Stamm *Lp Corby* zu untersuchen, wurden wachstumsphasenabhängige Transkriptions- und Translationsanalysen mit *Lp Corby* Wildtyp und *knock-out* Mutanten für die Gene $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta fliA$ und $\Delta flaA$ durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die basale Expression von *fliA* in den späteren Wachstumsphasen unabhängig von RpoN und FleQ stattfindet. Erstmals konnte die *fliA* Expression auf RNA- und Protein-Ebene detailliert gezeigt werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals der Transkriptionsstartpunkt des Hauptregulators FliA bestimmt werden. Es zeigte sich sowohl eine RpoD (σ^{70}) Bindungsstelle, welche möglicherweise auch von RpoS (σ^S) erkannt wird. Ein Modell zur Regulation der *fliA* Expression beim Übergang in die transmissive Phase konnte in dieser Arbeit experimentell bestätigt und erweitert werden. Demnach kommt es in der exponentiellen Phase durch das Zusammenwirken von RpoD und DksA, aber unabhängig von FleQ, zur basalen *fliA* Promotoraktivität. Durch den Übergang in die transmissive Phase und direkte oder indirekte Interaktion mit FleQ sowie dem Alarmon ppGpp scheint es zu einem Austausch des Sigmafaktors σ^{70} gegen σ^S und dadurch zu einer Aktivierung der *fliA* Expression zu kommen.

Elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ defiziente Mutanten nicht flagelliert sind, obwohl sie (wie in den Expressionsstudien gezeigt) Flagellin produzieren. Ursache dafür ist wahrscheinlich der fehlende Basalkörper. Mutanten für $\Delta fliA$, $\Delta flaA$ und $\Delta fliD$ hatten ebenfalls keine Flagelle auf ihrer Oberfläche, zeigten aber eine ungewöhnliche, gerade *Hook* Struktur, die den von diesen Genen unabhängigen Zusammenbau des Basalkörpers demonstriert.

Weiterhin wurden durch *in silico* Studien 15 verschiedene *Legionella* Spezies in Bezug auf das Flagellensystem und ein putatives Chemotaxissystem untersucht. Dazu wurden Genome einiger Arten erstmalig sequenziert und mit bestehenden Genomdaten abgeglichen. So konnte *L. oakridgensis* als erste Art ohne Flagellen-Regulon und ohne Chemotaxissystem sequenziert werden. Andererseits konnten mit LLAP12, *L. bozemanii*, *L. gormanii* und *L. lytica* erstmals Stämme *in silico* beschrieben werden, die beide Systeme tragen.

Schlagworte: *Legionella pneumophila*, Paris, Corby, *Acanthamoeba castellanii*, Virulenz, Regulation, FleQ, RpoN, FliA, *Hook*, *in silico*, Flagellenregulon

Summary

Flagella are highly complex and conserved structures crucial for virulence and fitness of *Legionella pneumophila* (*Lp*). Together with many other virulence factors the flagellum is expressed in the transmissive phase and enables the bacteria to reach the host cell for intracellular replication.

This work focused on the analysis of factors contributing to the regulation of the flagellum self-assembly. A combined replication/survival assay with *Lp* Corby or *Lp* Paris and their corresponding regulatory mutants was performed using the natural host *Acanthamoeba castellanii*. This assay allows detecting even small defects in adhesion, uptake, replication, extracellular survival and the ability to reinfect the host. A reduced fitness could be verified for $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$ and $\Delta fliA$ deficient strains with a more prominent defect in *Lp* Paris than in *Lp* Corby. With this infection model a reduced fitness could be demonstrated for the first time for the regulatory factors RpoN and FleQ.

Former published microarray-data implicated that FleQ, RpoN and FliA are the most important regulators of flagellum assembly in *Lp* Paris. For experimental validation of these data and to answer the question if these insights are transferable to strain *Lp* Corby, a growth phase dependent analysis of transcription and translation rates was done with *Lp* Corby wild-type and the $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta fliA$ and $\Delta flaA$ deficient strains. A regulation of *fliA* expression independently from RpoN and FleQ was shown in the later growth phases. Among other results, these experiments provide the first complete growth-phase dependent analysis of *fliA* expression on RNA and protein level.

Furthermore the transcriptional start site of *fliA* could be shown for the first time. A RpoD (σ^{70}) binding site could be identified which may be also recognized by sigma factor RpoS (σ^S). These findings led to a model for the regulation of the *fliA* expression during the switch from replicative to transmissive phase. According to this model RpoD and DksA lead to a basal *fliA* promotor activity, independently from FleQ. Most likely, during transition to stationary phase, direct or indirect interaction with FleQ and the alarmone ppGpp results in the exchange of the sigma factor σ^{70} and the binding of RpoS. This leads to the activation of *fliA* expression.

Electron microscopic studies revealed that $\Delta rpoN$ and $\Delta fleQ$ deficient mutants are not flagellated although (as shown in the protein expression studies) flagellin is produced. As direct causation the missing basal body could be identified. Mutants of $\Delta fliA$, $\Delta flaA$ and $\Delta fliD$

were also aflagellated, but there was a uncommon straight hook structure visible which demonstrates a filament-independent assembly of the basal body.

Furthermore, *in silico* analysis was done with 15 *Legionella* species with regard to the flagellum regulation system and a possible existing chemotaxis system. Therefore several genomes were sequenced and aligned with already available genomes. Analysis revealed that the strain *L. oakridgensis* is the first *Legionella* strain lacking a flagella regulon and a chemotaxis system. On the other hand the strains LLAP12, *L. bozemanii*, *L. gormanii* and *L. lytica* could be characterized as strains carrying both, a flagella-regulon and a chemotaxis system.

Keywords: *Legionella pneumophila*, Paris, Corby, *Acanthamoeba castellanii*, virulence, regulation, FleQ, RpoN, FliA, hook, *in silico*, flagellar regulon

1. Einleitung

1.1 Der Genus *Legionella*

Der erst vor etwa 30 Jahren entdeckte Genus *Legionella* in der Familie der *Legionellaceae* gehört zu den γ -Proteobakterien (Benson and Fields 1998). Die fakultativ intrazellulären Bakterien kommen ubiquitär vor und sind überwiegend pathogen (Meyer and Finegold 1980; Edelstein and Meyer 1984). Zurzeit sind 51 Spezies mit mindestens 73 Serogruppen bekannt (Lück et al. 2010) (<http://www.dsmz.de>; <http://www.bacterio.cict.fr/>). Von diesen sind die Serogruppen 1, 4 und 6 am häufigsten mit einer Legionelleninfektion assoziiert. Der Stamm mit der höchsten klinischen Relevanz ist *Legionella pneumophila*, gehört zur Serogruppe 1 und ist für fast 79 % der *Legionella* Infektionen verantwortlich (Brodhun and Buchholz 2011). Innerhalb dieser Art gehört der Sequenztyp 1 (ST 1) aufgrund seiner weiten Verbreitung zu den häufigsten Erregern (siehe Kapitel 1.3.3). Humane *Legionella*-Isolate sind hochvirulent. Zu diesen Stämmen gehört der hauptsächlich in dieser Arbeit verwendete Stamm *L. pneumophila* Corby, dessen Genom bereits vollständig sequenziert wurde (Glöckner et al. 2008). Bislang wurden 19 weitere *Legionella* Spezies als humanpathogen eingestuft (Muder and Yu 2002; Diederer 2008). Neben den klassischen Vertretern wurden auch *Legionella*-ähnliche Bakterien beschrieben. Diese wurden aus Patientenmaterial oder Umweltproben isoliert und in Ko-Kultur mit Protozoen angezüchtet. Bisher sind 12 sogenannte *Legionella-like-amoebal pathogens* (LLAP) beschrieben (Drozanski 1956; Adeleke et al. 1996; Newsome et al. 1998; Adeleke et al. 2001; La Scola et al. 2004). Die Stämme LLAP 10 und 12 werden im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet.

1.2 Biologie und Habitate von *Legionella pneumophila*

1.2.1 Biologie von *L. pneumophila*

Legionellen sind Gram-negative, aerobe, flagellierte Stäbchen mit einer Länge von 2-20 μm und einem Durchmesser von 0,5-0,7 μm (Blackmon et al. 1981). Die Bakterien können sich bei Temperaturen von 25-42°C vermehren (Katz and Hammel 1987). Lange Zeit wurde angenommen, dass nur Aminosäuren als Energie- und Kohlenstoffquelle dienen (George et al. 1980). Vor kurzem konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Legionellen auch Kohlenhydrate wie Stärke und Glykogen verstoffwechseln können (Eylert et al. 2010; Herrmann et al. 2010).

1.2.2 *Legionella* im natürlichen Habitat

In der Umwelt können Legionellen in 80 % der Frischwasserhabitate nachgewiesen werden. Aus diesem Grund werden die Bakterien als Umweltkeime bezeichnet. Sie kommen dort freilebend oder in verschiedenen Protozoen vor. Beispiele für solche Protozoen sind *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Echinamoeba*, *Naegleria* und *Tetrahymenia* (Rowbotham 1986; Fields 1996; Fields et al. 2002). Durch die intrazelluläre Vermehrung erhalten die Legionellen Zugang zu den benötigten Nährstoffen, sind vor äußeren Einflüssen geschützt und können die Wirtszelle zu ihrem Nutzen manipulieren (Rowbotham 1980; Fliermans et al. 1981; Fields 1996). Das extrazelluläre Überleben wird dadurch erleichtert, dass die Bakterien bei geringem Nährstoffangebot in ein *viable but non culturable* (VBNC) Stadium übergehen können (Steinert et al. 2007). Auch in mikrobiellen Gemeinschaften konnten Legionellen bereits nachgewiesen werden. Diese als Biofilm bezeichneten Systeme stellen eine Quelle komplexer Nährstoffangebote dar und sind somit ein möglicher Vermehrungsort der Bakterien außerhalb von Wirtszellen (Rogers and Keevil 1992).

1.2.3 *Legionella* in künstlichen Habitaten

Wasser als hauptsächliches Reservoir für Legionellen umgibt auch den Menschen im hohen Maße. Durch die zunehmende Technisierung der Gesellschaft haben die Legionelleninfektionen immer weiter zugenommen. Dabei spielen vor allem die vom Menschen geschaffenen Wasserreservoirs, wie zum Beispiel Wasserleitungen, Klimaanlage, Kühltürme, Luftbefeuchter, Whirlpools und sogar zahnärztliche Wasserleitungen eine Rolle (Fliermans et al. 1981; Mahoney et al. 1992; Atlas et al. 1995; Steinert et al. 1998; Benkel et al. 2000; Mouchtouri et al. 2010). Inzwischen konnten humanpathogene Spezies wie *L. longbeachae* und *L. pneumophila* auch in Blumenerde nachgewiesen werden (Ruehlemann and Crawford 1996; Velonakis et al. 2010). Privathaushalte, Hotels und Krankenhäuser sind die häufigsten Infektionsquellen (Woo et al. 1992; Steinert et al. 2001). Besonders in älteren Wasserleitungen mit stagnierendem Wasserdurchlauf und einer Temperatur von 25-45°C können Legionellen gut überleben. Eine Erhitzung der Wassersysteme auf über 60°C, Kupfer-Silber-Ionisationsbehandlung oder Hyperchlorierung der betroffenen Rohrleitungssysteme können die Bakterien wirkungsvoll abtöten (Hentschel and Heudorf 2011; Schaefer et al. 2011). Letztendlich stellen alle kontaminierten Wasserquellen, die Aerosole erzeugen können, potentielle Ausbruchsquellen dar (Stout and Yu 1997).

1.3 Legionellose: Entdeckung, Erkrankung, Diagnostik, Therapie und Epidemiologie

1.3.1 Die Entdeckung eines neuen Erregers zweier Krankheitsbilder

Während des 58. Veteranentreffens der *American Legion of Pennsylvania* von 21.-24. Juli 1976 kam es im Bellevue Stratford Hotel in Philadelphia (USA) zu einem, durch einen bis dato unbekannten Erreger verursachten, folgeschweren Ausbruch einer Pneumonie. 182 Teilnehmer des Treffens erkrankten und 29 Personen starben an den Folgen. Zusätzlich erkrankten 39 Personen, die sich in der Nähe des Hotels aufgehalten hatten, 5 davon mit fatalem Ausgang. In Anlehnung an diesen Ausbruch wurde die Erkrankung *Legionnaires' Disease* (Legionärskrankheit) genannt. 6 Monate nach der vermeintlich ersten Epidemie wurde ein Bakterium als ätiologisches Agens identifiziert, welches nach den Erkrankten und der Lokalisation in der Lunge als *Legionella pneumophila* benannt wurde. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bakterien über Aerosole aus der Klimaanlage des Hotels verbreitet wurden (Fraser et al. 1977; McDade et al. 1977; Brenner et al. 1979; Jones and Hebert 1979). Durch retrospektive Studien konnte der älteste beschriebene Fall einer Infektion durch Legionellen auf das Jahr 1943 und die Spezies *L. micdadei* zurückgeführt werden (Hebert et al. 1980). Der erste *L. pneumophila* Stamm wurde schon im Jahr 1947 isoliert, konnte aber erst 1979 bestimmt werden (McDade et al. 1979). Nach dem Ausbruch einer fieberhaften Erkrankung von 144 Personen in Pontiac (Michigan, USA) im Jahre 1968 wurde ein zweites durch Legionellen verursachtes, milder verlaufendes Krankheitsbild definiert, das Pontiac-Fieber (Glick et al. 1978).

Man kann noch nicht genau sagen, ob als Auslöser dieses Krankheitsverlaufs „lebende“ Legionellen nötig sind oder die Inhalation toter Bakterien mit möglichen assoziierten Endotoxinen ausreicht (Edelstein 2007). Es wird vermutet, dass eine Infektion durch das Einatmen von Amöbenpartikeln geschieht, da häufig nur ein geringer Teil (1 %) der exponierten Personen erkrankt (Fraser et al. 1977; Den Boer et al. 2002; Garcia-Fulgueiras et al. 2003). Dies ist für aerogen übertragbare Krankheiten (wie zum Beispiel Masern, Tuberkulose) untypisch. Da Amöbenpartikel aufgrund ihrer Größe im Aerosol wahrscheinlich nicht homogen verteilt sind, wird dieser Übertragungsweg vermutet (Lück 2011). Aus diesem Grunde kann auch keine Korrelation zwischen der *Legionella*-Keimzahl im Wasser und einem Infektionsrisiko hergestellt werden (Dosis-Wirkungs-Paradox) (O'Brien and Bhopal 1993).

1.3.2 Legionellose: Pontiac-Fieber und Legionärskrankheit

Wie bereits erwähnt kann eine Infektion des Menschen durch Legionellen zwei sehr verschiedene Krankheitsbilder hervorrufen, die Legionärskrankheit und das Pontiac-Fieber (Diederer 2008). In Tab. 1 wurden ihre Charakteristika und Unterschiede kurz zusammengefasst.

Tab. 1: Charakteristika der Legionärskrankheit und des Pontiac-Fiebers. (Quelle: www.cdc.gov/Legionella/top10.htm)

	Legionärskrankheit	Pontiac-Fieber
Klinisches Bild	Lungenentzündung, Husten, Fieber, Körperschmerzen	Grippe-ähnliche Symptome ohne Pneumonie (Fieber, Abgeschlagenheit, Schüttelfrost)
Inkubationszeit	2-14 Tage nach Exposition	1-2 Tage nach Exposition
Infektionsrate bei exponierten Personen	< 5 %	> 90 %
Isolation der Bakterien	möglich	nahezu nie
Todesfälle	5 -40 %	0 %

Die milde Verlaufsform der Legionellose, das Pontiac-Fieber, zeigt grippe-ähnliche Symptome, die aber ohne Behandlung wieder abklingen (Fields et al. 2002). Die Legionärskrankheit hat einen ungleich schwereren Verlauf. Nach einer relativ kurzen Inkubationszeit zeigen sich hohes Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen und schließlich eine schwere Lungenentzündung. In schweren Fällen kommt es zu Schädigungen der Nieren und des zentralen Nervensystems mit Verwirrtheit und Delirium (Fields et al. 2002). Schließlich kann durch respiratorische Insuffizienz und Sepsis ein tödlicher Verlauf eintreten (Edelstein 2008). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch konnte bislang nicht beobachtet werden (Katz et al. 1982; Fields 1996).

1.3.3 Diagnostik und Therapie

Die Auslöser einer Legionärskrankheit können sowohl von ambulantem, nosokomialen, aber auch Reise-assoziiertem Ursprung sein (Levin 2009) (Abb. 1). Über das gesamte Jahr

hinweg werden Infektionen beschrieben, aber besonders während der wärmeren Jahreszeit können sporadische oder epidemische Häufungen von Infektionen auftreten. In dieser Zeit wird das Wachstum der Bakterien durch warme Umgebungstemperaturen gefördert. Doch auch im Winter kann die Verbreitung der Erreger aus Kühltürmen über die Luft erfolgen. Vor kurzem kam es in Ulm zu einer starken Häufung von Infektionen im Winter (von Baum et al. 2010). Neben der Menge der eingeatmeten Erreger sind das Alter, Immunsuppression, starkes Rauchen und Vorerkrankungen des Respirationstraktes des Patienten Risikofaktoren für eine Erkrankung. Zusätzlich ist das Geschlecht ein Risikofaktor. Männer erkranken häufiger an Legionellose als Frauen. Das wird unter anderem durch die unterschiedlichen Lebensweisen der Geschlechter erklärt (Broome and Fraser 1979; Marston et al. 1994).

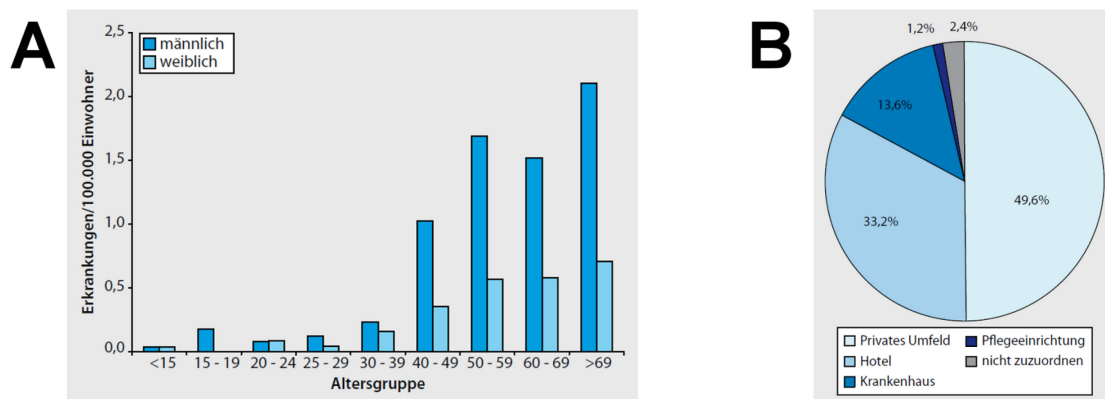


Abb. 1: An das Robert Koch-Institut übermittelte Fälle von Legionärskrankheit im Jahr 2009. (A) Verteilung in Deutschland pro 100.000 Einwohner nach Geschlecht und Alter (n=503). (B) Verteilung nach angegebenem Expositionsort (n=240) (Brodhun and Buchholz 2011).

Bei Patienten mit einer schweren Pneumonie kann anhand von Symptomen oder Röntgenaufnahmen nicht auf eine Infektion mit Legionellen rückgeschlossen werden (Fields et al. 2002) (Abb. 2A). Das Krankheitsbild unterscheidet sich kaum von dem anderer respiratorischer Erreger. Nach der Entdeckung der Legionellen wurden Infektionen häufig durch Kultivierung der Bakterien aus respiratorischen Materialien, Lungengewebe oder Pleuraflüssigkeit durchgeführt (Abb. 2B). Dieser Nachweis zeichnet sich besonders durch hohe Sensitivität und Spezifität (80 % bzw. 100 %) aus. Allerdings ist die Methode der Kultivierung sehr zeit- und arbeitsintensiv. Vor ein paar Jahren wurde ein Urin-Antigen-Test für den Nachweis von Legionellen entwickelt. Diese hat den Vorteil einer raschen

Durchführung, ist aber weniger sensitiv bzw. spezifisch (70 % / 100 %). Außerdem können bisher nur *L. pneumophila* der Serogruppe 1 detektiert werden. In den letzten Jahren werden Legionellen auch immer häufiger durch PCR von Patientenmaterial nachgewiesen. Allerdings kann die Sensitivität hierbei schwanken. Im Weiteren können die Bakterien auch über direkte Immunfluoreszenz mit der *direct fluorescent antibody testing* (DFA) Methode detektiert werden (Sensitivität: 25-75 %, Spezifität: 95 %) (www.hpa.org.uk; tu-dresden.de/die_tu_dresden/fakultaeten/medizinische_fakultaet/inst/mib/diagnostik/Konsiliarlabore/Legionellen; www.rki.de) (Lück and Steinert 2006; Lück 2008).

Für die Feintypisierung von *Legionella pneumophila* ist das sogenannte *Sequence-Based-Typing* (SBT) der anerkannte Goldstandard. Dabei werden partielle DNA-Sequenzen von sieben virulenzassoziierten Genen (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *momp*, *proA* und *neuA*) genutzt. Aus der siebenstelligen Zahl wird dann der Sequenztyp (ST) definiert (Ratzow et al. 2007). Dies erspart den Austausch von Stämmen zwischen den Laboren und ermöglicht eine schnelle Untersuchung von Ausbrüchen wenn zum Beispiel Erkrankungs- und Infektionsort weit voneinander entfernt liegen (Lück et al. 2008).

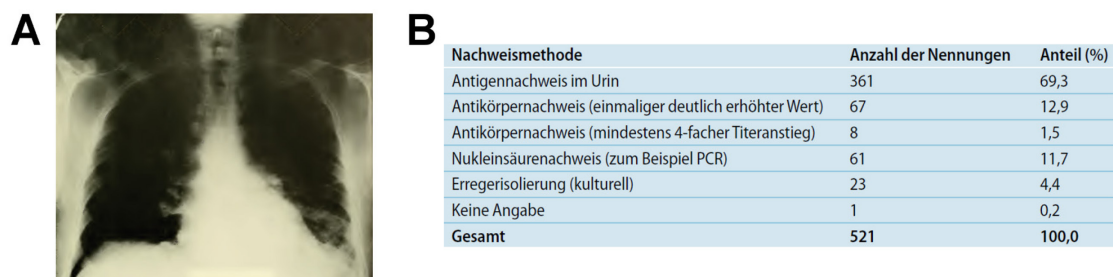


Abb. 2: Röntgenaufnahme und Nachweismethode. (A) Röntgenaufnahme einer infizierten Lunge. Gezeigt ist eine Aufnahme am 4. Tag der Hospitalisierung des Patienten. Zu sehen sind Infiltrationen an der Basis des linken Lungenflügels, im zentralen Bereich der beiden Lungenflügel sowie im linken infraklavikulären Bereich der Lunge (Jones and Hebert 1979). **(B) An das RKI übermittelte Fälle von Legionärskrankheit, aufgelistet nach Nachweismethode, Deutschland, 2009 (Mehrfachnennung möglich, n=523 Nennungen bei 503 Fällen) (Brodhun and Buchholz 2011).**

Die Legionärskrankheit ist im Allgemeinen durch eine zeitnahe Gabe von Antibiotika gut behandelbar. Ein zeitnaher Beginn ist wichtig, da die Mortalitätsrate ansonsten stark ansteigt (Heath et al. 1996). Aus diesem Grund und aufgrund der Dauer der Legionellen-Diagnostik wird bei schweren Pneumonien häufig mit Breitband-Antibiotika behandelt. Bis

vor einigen Jahren wurde die Legionärskrankheit allgemein mit dem Antibiotikum Erythromycin behandelt. Inzwischen werden meist Makrolidantibiotika (z.B. Azithromycin, Clarithromycin, Roxithromycin) und Breitspektrum-Fluorochinolone (z.B. Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Levofloxacin) verwendet, da diese schneller gegen Bakterien wirken können. Weniger häufig werden auch Rifampicin und Tetracycline wie Doxycyclin und Tigecyclin eingesetzt (Diederer 2008; Pedro-Botet and Yu 2009). Aufgrund des schwachen Verlaufs und der Selbstlimitation ist bei Pontiac-Fieber keine Antibiotikagabe notwendig (www.rki.de) (Stout and Yu 1997; Ewig et al. 2002; Mandell et al. 2003; Lück and Steinert 2006). Im Gegensatz zu anderen Bakterienarten wurden bei *Legionella* bisher keine multiplen Antibiotikaresistenzen gefunden. Es gibt aber Hinweise, dass *Legionella* Resistenzen gegen Antibiotika (Fong et al. 2010) und Transporter für Schwermetalle besitzt (D'Auria et al. 2010).

1.3.4 Epidemiologie von *Legionella* spp.

Mit Einführung des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) im Januar 2001 wurden Legionelleninfektionen erstmalig meldepflichtig (Kerwat et al. 2009). Durch die zunehmende Technisierung der Gesellschaft, aber auch durch die weiter verbesserte *Legionella*-Diagnostik haben die Legionelleninfektionen immer weiter zugenommen. Jedes Jahr werden dem Robert Koch-Institut etwa 500 Legionellosen übermittelt (2009: 503 Fälle). Die bundesweite Inzidenz lag bei durchschnittlich 6,1 Erkrankungen pro 1 Million Einwohner. In 35 Fällen kam es zum krankheitsbedingten Tod des Patienten. Dies entspricht einer Letalität von 7 %. Dabei ist die Letalität bei nosokomialen Infektionen mit 17 % am höchsten, während reiseassoziierte Fälle die geringste Letalität besaßen (5,6 %). Für 102 (20,3 %) der übermittelten Erkrankungsfälle wurde lediglich *Legionella* spp. als Erreger benannt. Bei 386 Erkrankungen (97,0 %) konnte *Legionella pneumophila* nachgewiesen werden. 12 Fälle (3,0 %) entfielen auf andere, nicht näher beschriebene *Legionella* Spezies. Bei *L. pneumophila* Fällen mit bekannter Serogruppe überwog die Serogruppe 1 mit 78,8 %. Jeder sechste Erkrankte hat sich während des Inkubationszeitraums im Ausland aufgehalten. Die häufigsten genannten Länder waren die klassischen Urlaubsländer Italien, Spanien und die Türkei (Brodhun and Buchholz 2011). Einen aktuellen Ausbruch in Deutschland gab es, wie bereits erwähnt, in Süddeutschland zum Jahreswechsel 2009/2010 zu einer Häufung mit mehr als 65 Erkrankungen und 5 Todesfällen. Als Ursache konnte ein Nasskühlwerk auf einem Bürogebäude in der Ulmer Innenstadt identifiziert werden (von Baum et al. 2010).

Nach Schätzungen des „Kompetenznetzwerks für ambulant erworbene Pneumonien“ (CAPNETZ, <http://www.capnetz.de>) werden in Deutschland etwa 4 % aller ambulant erworbenen Pneumonien durch Legionellen verursacht (von Baum et al. 2008). Hochrechnungen kämen somit auf ca. 20.000 Fälle pro Jahr. Zusammen mit den 500 tatsächlich gemeldeten Fällen wird eine starke Untererfassung deutlich. Ein Grund dafür ist wie bereits erwähnt die allgemeine Behandlung von Pneumonien mit Antibiotika ohne eine differenzierte *Legionella*-Diagnostik. Eine monatlich aktualisierte Übersicht über Legionelleninfektionen in Europa stellte bis 2010 die *European Working Group for Legionella Infections* (EWGLI-NET, <http://www.ewgli.org>) zur Verfügung (Joseph and Ricketts 2007). Im Anschluß daran wurde die überregionale Zusammenarbeit unter dem Namen ELDS-NET (*European Legionnaires' Disease Surveillance-Network*) am *European Centre of Disease Control* (ECDC, <http://ecdc.europa.eu>) in Stockholm weitergeführt. Deutschland kann allerdings aufgrund der fehlenden Rechtsgrundlage bisher nicht aktiv daran teilnehmen.

1.4 Diversität innerhalb der Genome verschiedener *L. pneumophila* Stämme

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit sind fünf Genome von *L. pneumophila* vollständig sequenziert. Diese Stämme sind Philadelphia I, Lens, Paris, Corby and Alcoy, jeweils benannt nach dem Ort des Ausbruchs (Cazalet et al. 2004; Chien et al. 2004; Glöckner et al. 2008; D'Auria et al. 2010). Die Genome dieser Stämme haben ähnliche Eigenschaften wie den G/C-Gehalt von etwa 38 % und die Größe des Genoms. Geringe Unterschiede bestehen in der putativen Anzahl der Gene und der kodierten Proteine. Auffallend ist, dass zwei der Stämme (Lens und Paris) zusätzlich noch ein Plasmid tragen (Tab. 2). Vor kurzem ist mit dem Stamm *Legionella longbeachae* NSW150 das erste non-*pneumophila* Genom veröffentlicht worden (Cazalet et al. 2010). Die Unterschiede zu diesem Stamm sind größer als innerhalb von *L. pneumophila*. Das *L. longbeachae* Genom ist etwa um 15 % größer und hat mehr putative Gene und Proteine. Der G/C-Gehalt beträgt nur 37 %. Der Stamm trägt allerdings auch ein Plasmid (Tab. 2). Etwa 2.400 Gene sind ortholog innerhalb der verschiedenen *L. pneumophila* Stämme und bilden das Kerngenom dieser Spezies. Die bestehenden Unterschiede zwischen den Genomen erklären die verschiedenen Fähigkeiten der Stämme sich intrazellulär in Protozoen zu vermehren oder als Auslöser der Legionärskrankheit zu dienen (Cazalet et al. 2008b). Horizontaler Gentransfer ist wahrscheinlich die wichtigste Ursache für die Variation

der Genome. Dies wird durch das Vorhandensein von Plasmiden, genomischen Inseln, Insertions(IS-)Elementen und Transposasen bestätigt (Cazalet et al. 2008b).

Tab. 2: Eigenschaften von vollständig sequenzierten Genomen von *Legionella* spp..

Organismus	Länge des Genoms	Gene / Proteine	G/C Gehalt	Plasmid (Anzahl)	Referenz
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia I	3.397.754 nt	3003 / 2943	38 %	nein	(Chien et al. 2004)
<i>L. pneumophila</i> Lens	3.345.687 nt	3001 / 2878	38 %	ja (1)	(Cazalet et al. 2004)
<i>L. pneumophila</i> Paris	3.503.610 nt	3136 / 3027	38 %	ja (1)	(Cazalet et al. 2004)
<i>L. pneumophila</i> Corby	3.576.470 nt	3257 / 3204	38 %	nein	(Glöckner et al. 2008)
<i>L. pneumophila</i> Alcoy	3.516.334 nt	3243 / 3190	38 %	nein	(D'Auria et al. 2010)
<i>L. longbeachae</i> NSW150	4.077.332 nt	3664 / 3403	37 %	ja (1)	(Cazalet et al. 2010)

1.4.1 Genomische und Pathogenitätsinseln von *Legionella*

Pathogenitätsinseln (PAIs) sind mobile, virulenzassoziierte Elemente innerhalb eines Genoms. Zuerst beschrieben wurden solche Elemente in uropathogenen *E. coli* (Hacker and Kaper 2000; Dobrindt et al. 2010). Aber auch andere pathogene Bakterienarten tragen PAIs, zum Beispiel *Pseudomonas* (Kung et al. 2010), *Helicobacter* (Fischer et al. 2009) oder *Salmonella* (Valdez et al. 2009). Charakteristische Eigenschaften von PAIs sind ein veränderter G/C-Gehalt dieser Region im Vergleich zum restlichen Genom, *direct repeats* (sich wiederholende DNA-Sequenzen) in Verbindung mit t-RNA Genen an beiden Enden, das Vorhandensein von Integrasen und ähnlichen mobilitätsassoziierten Proteinen und die genetische Instabilität solcher Elemente (Hacker and Kaper 2000).

Genomische Inseln (GEIs) haben ähnliche Eigenschaften wie PAIs allerdings mit der Ausnahme, dass sie nicht mit Virulenz in Verbindung gebracht werden (Dobrindt et al. 2004). GEIs kommen ebenfalls in den verschiedensten Bakterien vor, zum Beispiel *Salmonella* (Hall 2010) oder *Vibrio* (Cho et al. 2010).

L. pneumophila trägt verschiedene solcher GEIs und PAIs, welche sich durch ihr Vorkommen in verschiedenen Stämmen, ihre Größe und die kodierten Proteine unterscheiden. Innerhalb des Genoms kommen diese Elemente hauptsächlich in Bereichen hoher Plastizität

vor (Cazalet et al. 2008b). Ein Beispiel für eine Pathogenitätsinsel ist die Region, die für das Lvh Typ IV Sekretionssystem kodiert. Die Insel kann als ins Genom integrierte Form oder als multiples Plasmid vorkommen. Der *lvh* Gencluster selbst ist hoch konserviert in den Stämmen Lens, Paris und Philadelphia I, während die flankierenden Bereiche in Größe und genetischer Information Stamm-spezifisch variieren. Weiterhin ist die Insel im Stamm Philadelphia I in Arginin-tRNA integriert und in den Stämmen Paris und Lens in dieselbe tmRNA (Segal et al. 1999; Cazalet and Buchrieser 2006). Die Stämme *L. pneumophila* Corby und Alcoy tragen zwei genomische Inseln, Trb-1 und Trb-2 (Glöckner et al. 2008; D'Auria et al. 2010). Auf beiden Inseln sind die notwendigen Gene für ein funktionelles Typ IV Sekretionssystem kodiert. Die *tra/trb* Regionen sind denen des Plasmids R751 von *Enterobacter aerogenes* sehr ähnlich (Thorsted et al. 1998) und haben ebenfalls einen *origin of transfer* (*oriT*).

Trb-1 integriert in eine Prolin-tRNA und Trb-2 in eine tmRNA. Die Integrationsstelle von Trb-2 ist identisch zur *lvh* Insel in den Stämmen Paris und Lens. Beide Inseln können als integrierte Form oder außerhalb des Genoms vorliegen (Steinert et al. 2007; Glöckner et al. 2008). Der Stamm Philadelphia I trägt eine 65 kb große Insel, LpPI-1, welche in Paris, Lens und Corby nicht zu finden ist. Diese ist in eine Valin-tRNA integriert und kodiert für putative Virulenzfaktoren und einen Gencluster mit zu *E. coli* homologen Tra Proteinen. Die Anordnung der Gene ist zu denen auf dem F-Plasmid von *E. coli* identisch. Nur die Gene *traM*, *traY* und *traX* fehlen (Brassinga et al. 2003; Cazalet and Buchrieser 2006).

1.4.2 Plasmide in *Legionella*

Es gibt einige *Legionella* Stämme, die unterschiedlich große Plasmide tragen. *Lp* Lens besitzt ein 60 kb großes, *Lp* Paris ein 132 kb großes und *L. longbeachae* ein 72 kb großes Plasmid. Alle Plasmide tragen verschiedene mobile Elemente und Gencluster homolog zu Tra Proteinen. Das Plasmid von *Lp* Paris trägt außerdem putative Antibiotikaresistenzen (Steinert et al. 2007; Cazalet et al. 2008b). Das Plasmid von *L. longbeachae* trägt unter anderem ein Lvh Typ IVA Sekretionssystem (Cazalet et al. 2010). Aufgrund der Ähnlichkeiten der Plasmide wird vermutet, dass die Plasmide zwischen den verschiedenen *Legionella* Spezies übertragen werden können. Eine experimentelle Bestätigung wurde aber noch nicht erbracht.

1.5 Der intrazelluläre Lebenszyklus von *L. pneumophila*

In der Natur replizieren Legionellen in Protozoen. Die dort benutzten Mechanismen werden auch bei Infektionen von humanen Alveolarmakrophagen genutzt. In beiden Fällen wird der Lebenszyklus in zwei Phasen eingeteilt, eine replikative (nicht-virulente) und eine transmissive (virulente) Phase. Dieser Abschnitt zeigt einen kurzen Überblick über diese Phasen, deren Definition und die Regulation des Lebenszyklus von *Legionella*.

1.5.1 Der Infektionszyklus in Wirtszellen

Der Infektionszyklus von *L. pneumophila* ist in Protozoen und humanen Makrophagen ähnlich. Abhängig von der Wirtszelle können aber verschiedene Mechanismen für den Eintritt und den Austritt aus der Wirtszelle genutzt werden (Harb et al. 1998; Fields et al. 2002; Garduno 2007; Ninio and Roy 2007). Der Weg der Infektion von *Legionella* ist schematisch in Abb. 3 dargestellt.

Nach der Aufnahme mittels Phagozytose verbleiben die Bakterien in einem Phagosom, welches aber nicht in den phagolysosomalen Weg eintritt. *Legionella* verhindert dabei mit Hilfe des *dot/icm* Systems (*defect in organelle trafficking/intracellular multiplication*) aktiv die Fusion mit dem Lysosom und somit eine Ansäuerung des Phagosoms (Horwitz 1983; Horwitz and Maxfield 1984; Roy et al. 1998). Dabei entsteht eine Vakuole (*Legionella containing vacuole*, LCV), die vollständig vom endosomalen Weg isoliert ist, aber trotzdem von Endoplasmatischem Retikulum umgeben ist. Innerhalb dieser Vakuole repliziert *Legionella*. In der späten replikativen Phase verschmilzt die Vakuole mit Lysosomen, wodurch den Bakterien viele Nährstoffe zugeführt werden (Sturgill-Koszycki and Swanson 2000).

Nährstoffmangel führt schließlich zum Übergang der Legionellen in die transmissive Phase (Byrne and Swanson 1998). Aufgrund der großen Anzahl von beweglichen Bakterien in der Vakuole steigt der Druck stark an. Es wird vermutet, dass dies der Grund für das Platzen der LCV ist und schließlich zur Freisetzung der Legionellen führt, wodurch neue Wirtszellen infiziert werden können (Swanson and Hammer 2000; Molofsky and Swanson 2004; Swanson and Molofsky 2005; Isberg et al. 2009).

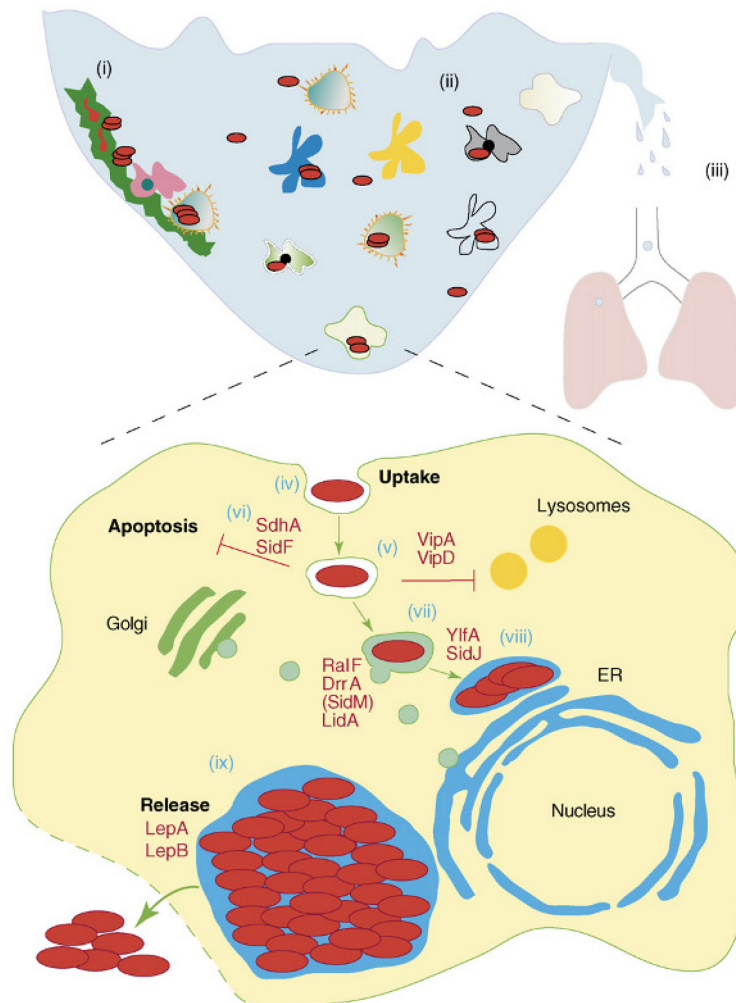


Abb. 3: Der Lebenszyklus von *L. pneumophila*. *Legionella* kommt in der Umwelt in Biofilmen (I) oder in planktonischer Form (II) vor und repliziert intrazellulär in Protozoen. Legionellen können über eingeatmete Aerosole in die Lunge des Menschen gelangen (III). Dort werden Alveolarmakrophagen als Wirt genutzt. Nach der Phagozytose der Bakterien (IV) werden Faktoren sekretiert, die die Ansäuerung der Vakuole (V), die Apoptose des Makrophagen (VI) und somit eine Immunreaktion verhindern. Weitere Faktoren führen zur Rekrutierung von Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums (ER) und Mitochondrien (VII). Schließlich verschmilzt die Vakuole mit dem ER (VIII). Innerhalb dieser Vakuole repliziert sich *Legionella*, bis die Nährstoffe knapp werden. Zu diesem Zeitpunkt gehen die Bakterien in die transmissive Phase über, lysieren die Wirtszelle und können weitere Wirtszellen infizieren (IX). Rot dargestellt sind *dot/icm* abhängig sekretierte Effektoren, die an dem jeweiligen Schritt beteiligt sind (Ninio and Roy 2007).

1.5.2 Charakterisierung der replikativen und der transmissiven Phase

Der biphasische Lebenszyklus kann auch in Flüssigmedium simuliert werden, wodurch experimentelle Analysen sehr viel einfacher und genauer durchgeführt werden können. Im Medium entspricht das exponentielle Wachstum der Bakterien der replikativen Phase und die anschließende stationäre Phase entspricht dem transmissiven Phänotyp der Legionellen (Byrne and Swanson 1998). In beiden Wachstumsphasen kommt es zur völlig unterschiedlichen Genexpression (Brüggemann et al. 2006)(Abb. 4).

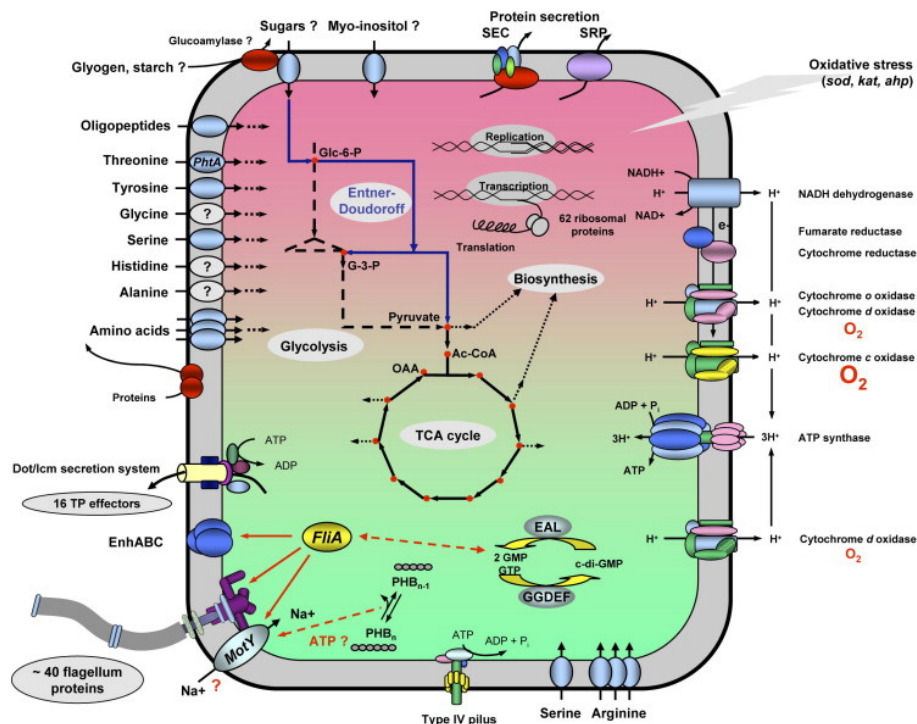


Abb. 4: Der zweiphasige Lebenszyklus von *Legionella* auf Transkriptionsebene. In der replikativen Phase hochregulierte Gene sind rot unterlegt und die Gene der transmissiven Phase grün. Die wichtigsten Merkmale der replikativen Phase sind die Expression von Genen für Aminosäure-, Zucker- und Oligopeptidtransporter, Proteasen, die Glykolyse und den Entner-Doudoroff-Weg, Sec- und SRP (*signal recognition pathway*) abhängige Sekretion, Oxidativer Stress-Antwort-Proteine und die Replikations-, Transkriptions- und Translationsmaschinerie. In der transmissiven Phase hochregulierte Gene kodieren für Serin- und Arginin-Transporter, Typ IV Pilus Biosynthese, GGDEF/EAL Proteine, Synthese und Degradation von Polyhydroxybutyrat (PHB), invasionsvermittelnde Wege (z.B. EnhABC) und die Sekretion von über das Typ IV dot/icm System ausgeschleusten Wirtszellmodulatoren. Im Weiteren kommt es zur regulierten Ausbildung eines komplexen Flagellensystems am Pol der Zelle (Jules and Buchrieser 2007).

Die Bakterien beider Phasen besitzen aufgrund der veränderten Expression unterschiedliche Eigenschaften (Tab. 3). Replikative Legionellen sind nicht flagelliert, salzresistent und befinden sich innerhalb der Wirtszelle. Im Gegensatz dazu sind Bakterien der transmissiven Phase motil, salzsensitiv, flagelliert und haben viele virulente Eigenschaften (Byrne and Swanson 1998; Hales and Shuman 1999b; Heuner et al. 1999; Sturgill-Koszycki and Swanson 2000; Joshi et al. 2001; Hammer et al. 2002; Zusman et al. 2002; Bachman and Swanson 2004a; Jacobi et al. 2004). Einen Überblick über diese Eigenschaften zeigt Tab. 3. Nachdem die Legionellen eine neue Wirtszelle infiziert haben, treten sie erneut in die replikative Phase ein.

Tab. 3: Expression verschiedener Eigenschaften von *L. pneumophila* in der replikativen und der transmissiven Phase. +, Aktivierung; -, Reprimierung.

Eigenschaft	Replikative Phase	Transmissive Phase
Replikation	+	-
Motilität / Flagellierung	-	+
Kontakt-abhängige Zytotoxizität	-	+
Stressresistenz	-	+
Salzsensitivität	-	+
Pigmentbildung	-	+
Polyhydroxybutyrat (PHB) Einlagerung	-	+
Kokkoide Zellform	-	+

1.5.3 Die MIF-Form von *Legionella*

Bei der Replikation in Wirtszellen können Legionellen neben der beschriebenen replikativen und transmissiven Form in eine dritte Lebensform übergehen. Dieser Zysten-ähnliche Zustand wird als MIF-Form bezeichnet (*mature intracellular form*) und wurden erstmals von Garduno und Kollegen beschrieben (Garduno et al. 1998b). Identifiziert wurden die verkürzten Stäbchen durch die Giménez-Färbung (Abb. 5A). Sie unterscheiden sich von den anderen beiden Formen durch erhöhte Poly- β -Hydroxybutyrateinschlüsse und zusätzliche zytoplasmatische Membranen. Bakterien in der MIF-Form sind resistent gegen Antibiotika und hohe pH-Werte. Weiterhin sind sie sehr viel virulenter als Legionellen der replikativen oder transmissiven Phase (Garduno et al. 2002; Faulkner et al. 2008). Ein genetischer Marker der MIF-Form ist MagA. Dieses Protein wird in diesen Zellen während des späten intrazellulären Wachstums gebildet (Hiltz et al. 2004). Bei der Anzucht in künstlichem Medium können nur die replikative und die transmissive Form nachgewiesen werden (Abb. 5B).

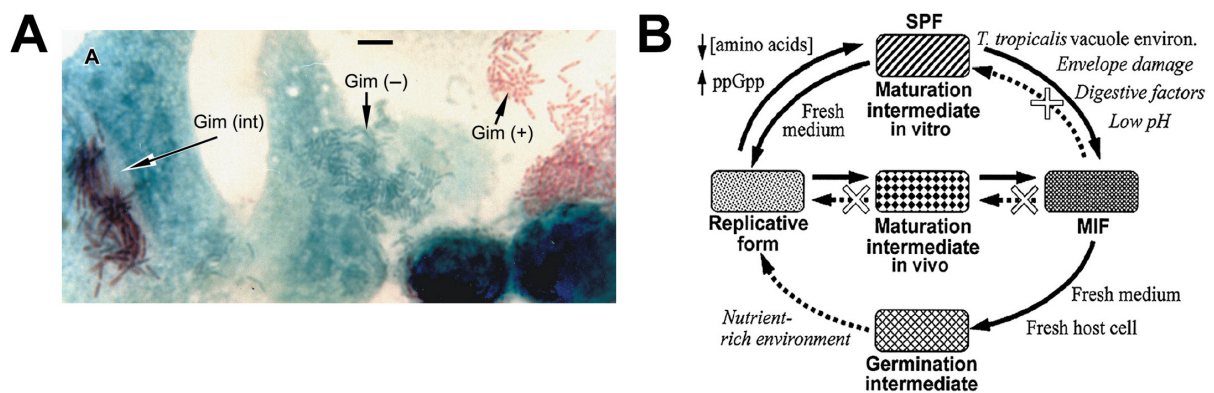


Abb. 5: MIF-Form von *Legionella*. (A) Mittels Giménez-Färbung (Gim) von infizierten HeLa-Zellen können zwei unterschiedliche Bakterienpopulationen detektiert werden. Gim-positive Bakterien in der MIF-Form (rot) und Gim-negative Bakterien in der stationären Phase (grün-blau). Es gibt auch Übergangsformen zwischen den beiden Stadien (Gim(int)) (Garduno et al. 2002). (B) Modell der verschiedenen Lebensformen. Intrazelluläres Wachstums in eukaryotischen Wirtszellen führt zu Bakterien der MIF-Form, während *in vitro* nur die replikative und die stationäre Form (SPF) von *Legionella* entstehen kann (Faulkner et al. 2008).

1.5.4 Regulation des Lebenszyklus von *L. pneumophila*

In *Legionella* wird der Übergang von der replikativen zur transmissiven Phase durch ein sehr komplexes regulatorisches Netzwerk gesteuert. Nicht alle Schritte sind bereits vollständig verstanden. In *E. coli* funktionieren das RNA-bindende Protein CsrA (*carbon storage regulator A*) und die regulatorischen RNAs *csrB* und *csrC* als globales post-transkriptionelles, regulatorisches System (Romeo 1998). Durch Bindung an die mRNA verschiedener Gene kann CsrA den Beginn der Translation unterdrücken. Die beiden regulatorischen RNAs binden an CsrA und unterstützen dessen Aktivität (Majdalani et al. 2005). Durch ein 2-Komponentensystem aus BarA und UvrY wird die Expression von *csrB* gesteuert. Durch diese autoregulatorische Schleife bleibt das System stabil. Durch einen RNase E-vermittelten Weg werden die regulatorischen RNAs abgebaut und CsrA freigesetzt (Suzuki et al. 2006). Homologe Systeme wurden auch in anderen Bakterien gefunden (Majdalani et al. 2005).

Für *Legionella* wird vermutet, dass ein CsrA Homolog von *E. coli* die Expression der transmissiven Eigenschaften in der replikativen Phase unterdrückt (Fettes et al. 2001; Molofsky and Swanson 2003). Für den Übergang in die transmissive Phase muss die Unterdrückung der mRNA Translation durch CsrA aufgehoben werden. In *L. pneumophila* übernimmt vermutlich das 2-Komponentensystem LetA/LetS diese Aufgabe. Diese Proteine sind homolog zu dem System BarA/UvrY von *E. coli* oder GacA/GacS von *Pseudomonas aeruginosa* (Hammer et al. 2002; Lynch et al. 2003; Majdalani et al. 2005). Nährstoffmangel ist dabei das entscheidende Signal um die CsrA-mRNA-Bindung durch LetA/LetS zu aufzuheben und die mRNAs für die RNA Polymerase freizusetzen (Molofsky and Swanson 2003). Durch LetA/LetS wird die Expression von einer oder mehreren regulatorischen RNAs induziert. Diese können anschließend CsrA binden. Es konnte gezeigt werden, dass in *Legionella* *rsmY* und *rsmZ* diese Rolle übernehmen (Rasis and Segal 2009; Sahr et al. 2009; Edwards et al. 2010).

Das 2-Komponentensystem LetA/LetS von *L. pneumophila* reagiert auf das Alarmon (Alarm-Hormon) (p)ppGpp (Hammer et al. 2002; Molofsky and Swanson 2003; Bachman and Swanson 2004b). Dieses wird unter Nährstoffmangel, im Speziellen bei Aminosäuremangel, durch RelA produziert und ausgeschüttet (Hammer and Swanson 1999; Hammer et al. 2002; Zusman et al. 2002; Jain et al. 2006). Im Weiteren sorgt Fettsäuremangel für die Aktivierung der Synthase / Hydrolase SpoT, welche ebenfalls (p)ppGpp produziert (Dalebroux et al. 2009).

Ein weiterer Faktor, der für den Lebenszyklus von *L. pneumophila* eine Rolle spielt, ist der alternative σ^S Faktor RpoS. Analog zu *E. coli* wurde vermutet, dass (p)ppGpp die Menge an RpoS erhöht. Allerdings konnte diese Verbindung bisher nicht gefunden werden (Abu-Zant et al. 2006). Es wird spekuliert, dass es stattdessen eine Verbindung zwischen LetA und RpoS gibt (Gal-Mor and Segal 2003; Bachman and Swanson 2004a; Broich et al. 2006). Diese Verbindung könnte mit dem Antwort-Regulator LqsR bereits gefunden worden sein. Dieses unterstützt die Zell-Zell-Interaktion zwischen Wirt und Bakterium und unterdrückt den Übergang von der transmissiven zur replikativen Phase (Tiaden et al. 2007; Tiaden et al. 2010). Ein aktuelles Modell für dieses komplexe regulatorische Netzwerk ist in Abb. 6 gezeigt.

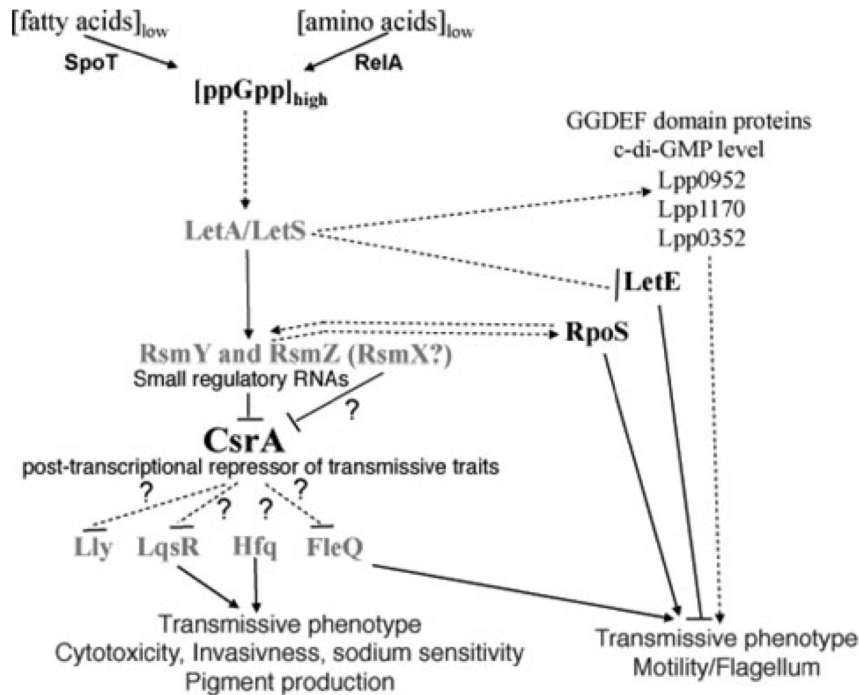


Abb. 6: Modell des regulatorischen Netzwerks in *L. pneumophila* für den Übergang von der replikativen zur transmissiven Phase. Während der transmissiven Phase sorgen Aminosäure- und Fettsäuremangel mittels RelA und SpoT für die Produktion des Alarmons (p)ppGpp. Dieses wird vermutlich durch LetS detektiert, welches dann LetA phosphoryliert. LetA bindet dadurch *upstream* der kleinen (nicht-kodierenden) ncRNAs RsmY und RsmZ und aktiviert deren Transkription. CsrA bindet in der Nähe der Ribosomenbindungsstelle an verschiedene mRNAs (z.B. Lly, LqsR, FleQ) und unterbindet deren Translation. Durch Bindung von RsmY und RsmZ an CsrA werden die mRNAs freigesetzt, können translatiert werden und der transmissive Phänotyp wird exprimiert. Im Gegensatz dazu ist die Flagellenbiosynthese wahrscheinlich von RsmYZ-CsrA unabhängig, aber von LetA/LetS abhängig. Das 2-Komponentensystem beeinflusst direkt oder indirekt die Menge an zyklischem dimeren GMP, welches die Motilität reguliert. RpoS ist ein positiver Regulator der Flagellensynthese, wahrscheinlich über eine Rückkopplungsschleife zwischen RsmY, RsmZ und RpoS. Legende: ?, hypothetischer Mechanismus; gepunktete Linie, unbekannter Mechanismus (Sahr et al. 2009).

1.6 Proteinsekretionssysteme von *L. pneumophila*

Für die Interaktion mit der Umwelt benötigen Bakterien Systeme, die Signale und Substrate über die beiden Membranen und den periplasmatischen Raum transportieren können. Aufgrund der Verbindung zur Virulenz von *L. pneumophila* werden meistens das Typ IV Sekretionssystem *dot/icm* und das Typ II Sekretionssystem Lsp genannt. *Legionella* besitzt allerdings noch weitere Protein-Sekretionssysteme. Diese sollen im Folgenden kurz besprochen werden.

1.6.1 Überblick über die Sekretionssysteme

In *L. pneumophila* sind bisher die Sekretionssysteme I bis VI (T1SS bis T6SS) beschrieben (Abb. 7). Dabei können Substrate in zwei Stufen über die Membranen geschleust werden oder auch ohne periplasmatischen Zwischenschritt. Letzteres trifft auf die Systeme I, III, IV und wahrscheinlich VI zu. Bei der Sekretion über das Typ II und Typ V Sekretionssystem gelangen die Proteine über den Sec- oder Tat- abhängigen Transport aus dem Zytosol ins Periplasma. Von dort werden sie über die äußere Membran geschleust. Durch das T3SS und den Kontakt mit einer Wirtszelle können Bakterien Substrate direkt in den Wirt injizieren. T4SS können Nukleinsäuren und Proteine in die Wirtszelle transportieren und dienen den Bakterien zur Konjugation untereinander (Sexton and Vogel 2002; Nagai and Roy 2003). Typ V Substrate sind Autotransporter (Lee and Schneewind 2001). Vor kurzem wurde ein T6SS beschrieben (Filloux et al. 2008). Der genaue Mechanismus ist aber noch nicht bekannt.

Für die Virulenz von *Legionella* sind mindestens das T2SS und das T4SS absolut notwendig. Ein Ausschalten eines dieser Systeme sorgt für eine stark verminderte Virulenz (Cianciotto 2001, 2005; De Buck et al. 2007; Gerlach and Hensel 2007). Im Weiteren wird der Flagellenapparat von *Legionella* als Typ III-ähnliches Sekretionssystem bezeichnet.

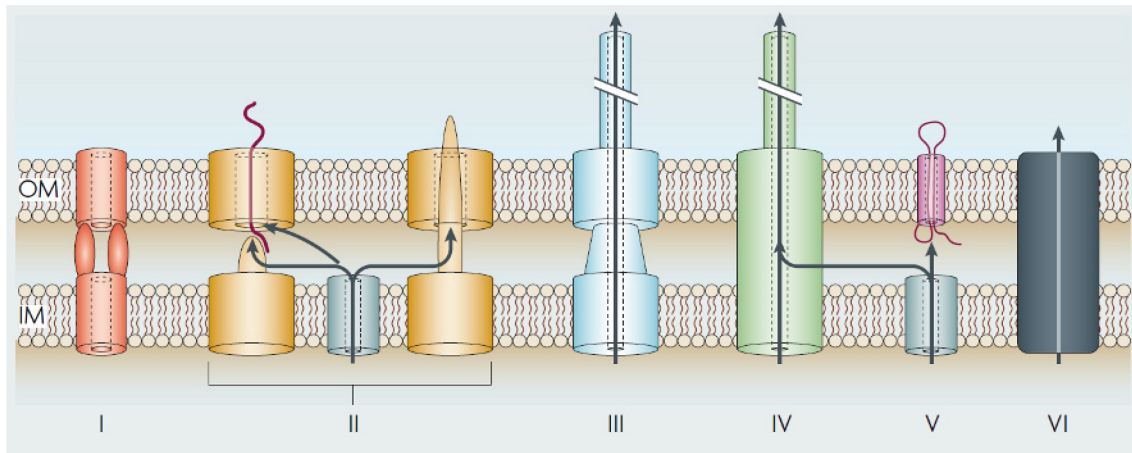


Abb. 7: Übersicht über Typ I-VI Sekretionssysteme bei Gram-negativen Bakterien. Bei den Sekretionssystemen des Typ I, III, IV und wahrscheinlich VI werden zu sekretierende Substrate direkt über die innere und äußere Membran und den dazwischen liegenden periplasmatischen Raum geschleust. Die Typ II Sekretion erfolgt zweistufig. Zuerst werden Proteine Sec- oder Tat-abhängig über die innere Membran ins Periplasma geschleust um von dort aus durch eine Pore durch die äußere Membran in die Umgebung zu gelangen. Bei der Typ III Sekretion wird das Substrat kontaktabhängig direkt in die Wirtszelle sekretiert. Der Flagellenapparat ist ein Typ III-ähnliches System. Die Typ IV Systeme können DNA oder Proteine in die Wirtszelle oder ins extrazelluläre Milieu sekretieren. Die Typ V Translokation erfolgt Sec-abhängig über die innere Membran. Die Pore in der äußeren Membran wird durch ein zweites Protein oder eine Domäne des sekretierten Proteins selbst gebildet. Abkürzungen: IM, innere Membran; OM, äußere Membran (outer membrane) (Abdallah et al. 2007).

1.6.2 Das Typ III Sekretionssystem

Die Flagelle von Gram-negativen Bakterien ist strukturell und funktionell sehr nah mit dem Typ III Sekretionssystem verwandt. Dieses wird auch als Injektisom bezeichnet, da damit Virulenzfaktoren direkt in das Zytoplasma von eukaryotischen Zellen transportiert werden können. Beschrieben wurde ein solches System bereits in *Salmonella sp.*, *Yersinia sp.*, enteropathogenen *E. coli*, *Shigella sp.* und *Chlamydia sp.* (Blocker et al. 2003; Galan and Wolf-Watz 2006). Die injizierten Effektorproteine können die Wirtszellfunktion beeinflussen oder das Zytoskelett der Membran verändert, so dass die Bakterien eindringen können.

Die Struktur des Injektisoms besteht aus drei Hauptbestandteilen. Der Basalkörper durchspannt wie bei der Flagelle die innere und äußere Membran sowie den periplasmatischen Raum und bildet das T3SS (Erhardt et al. 2010). Der Basalkörper besteht aus einem zytoplasmatischen C-Ring, einem die innere Membran durchdringenden MS-Ring und einem abschließenden Ring in der äußeren Membran (Erhardt et al. 2010) (Abb. 8).

Daran schließt eine extrazelluläre, hohle, tubuläre Struktur an (Tampakaki et al. 2004; Cornelis 2006). Die extrazellulären Vorsätze variieren je nach Familie des Injektisoms in Struktur und Länge. Zum Beispiel sind eine starre 58 nm lange Nadel bei *Yersinia enterocolitica*, ein bis zu 600 nm langes Filament bei *Escherichia coli* oder ein Hrp Pilus mit einer Länge von mehreren μm in *Pseudomonas syringae* beschrieben (Cornelis 2006). An die tubuläre Struktur schließt sich ein Translokonzonkomplex an, welcher eine Pore in der Wirtszellmembran bildet (Mattei et al. 2011). Auch der Zusammenbau des Injektisoms geschieht wie bei der Flagelle über eine regulierte Kaskade.

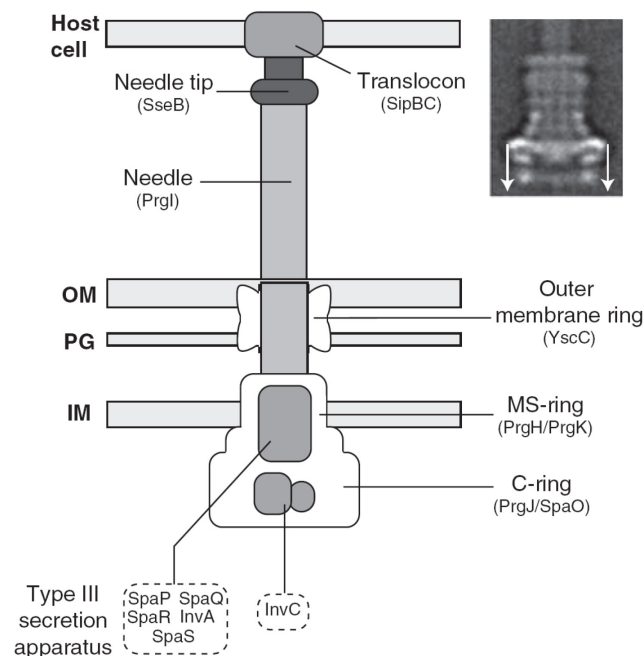


Abb. 8: Schematischer Überblick über das SPI-1 Injektisom von *Salmonella*. Das T3SS hat strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten zur Flagelle. Es besteht aus 3 Hauptbestandteilen. Eine gerade Nadelstruktur verbindet den Basalkörper in der inneren Membran mit dem Translokonzon-Komplex. Letzterer bildet eine Pore in der Membran eukaryotischer Zellen. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt ein Injektisom von *Salmonella enterica*. Abkürzungen: IM, innere Membran; PG, Peptidoglykanschicht; OM, äußere Membran (outer membrane) (Erhardt et al. 2010).

1.7 Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*

In der Umwelt repliziert sich *Legionella* innerhalb eines sehr breiten Spektrums von Protozoen. Für die Adaptation an so viele verschiedene Wirtszellen haben die Bakterien vielfältige Virulenzfaktoren und -mechanismen entwickelt. Dieselben virulenten Eigenschaften, die es *Legionella* ermöglichen dieses breite Wirtsspektrum zu besiedeln, machen es den Bakterien möglich humane Zellen zu infizieren. Besonders durch Kontaminationen der künstlichen Wassersysteme nehmen die Infektionen des Menschen immer weiter zu. Im Weiteren zeigen Bakterien, welche durch den natürlichen Wirt passagiert wurden, ein höheres Virulenzvermögen als im Medium gewachsene Legionellen (Brieland et al. 1996; Cirillo et al. 1999). Einige der virulenten Eigenschaften sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

1.7.1 Virulenzfaktoren auf der Oberfläche von *Legionella*

Virulenzfaktoren auf der Zelloberfläche verleihen den Bakterien einige sehr wichtige Eigenschaften im Zusammenspiel mit den Wirtszellen. Der *macrophage infectivity potentiator* Mip von *Legionella* ist eine PPIase mit Hydrolase-Aktivität. Mip ermöglicht den Legionellen die Lunge zu kolonisieren und sich in periphere Organe wie die Milz weiter auszubreiten. Durch Bindung an Kollagene der extrazellulären Matrix ermöglicht Mip den Bakterien den Durchtritt durch die Lungenepithelzellbarriere (Wintermeyer et al. 1995; Helbig et al. 2001; Helbig et al. 2003; Debroy et al. 2006a; Wagner et al. 2007).

Wenn Legionellen durch humane Makrophagen phagozytiert werden, spielt das *major outer membrane protein* Momp eine wichtige Rolle. Dieses bindet an das C3R-Protein des Komplementsystems der Wirtszelle. Der Komplementrezeptor CR1 bindet anschließend an C3R, was zur Aufnahme der Bakterien führt (Payne and Horwitz 1987; Bellinger-Kawahara and Horwitz 1990). Legionellen können aber auch Komplement-unabhängig aufgenommen werden. Hierzu dienen Carbohydrat- oder Lipidstrukturen auf der Oberfläche der Bakterien (Gibson et al. 1994). Eine Aufnahme durch Amöben wird durch Typ IV Pili und das Hsp-60 Protein (*heat shock protein, 60kD*) vermittelt (Garduno et al. 1998a; Stone and Abu Kwaik 1998). Im Weiteren dient *ligA* (*Legionella infectivity gene A*) der Adhäsion und beeinflusst die Aufnahme der Bakterien (Fettes et al. 2000).

Die Membran-assoziierte Phospholipase A PlaB ist verantwortlich für die zytotoxische Eigenschaft von *Legionella* und spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung der Bakterien in das umliegende Gewebe der Lunge (Flieger et al. 2004; Schunder et al. 2010).

1.7.2 Sekretierte Virulenzfaktoren von *Legionella*

Ein wichtiges Sekretionssystem für die Virulenz von *Legionella* ist das *lsp* T2SS. Dieses sekretiert unter anderem die Msp-Protease (Hales and Shuman 1999a), Saure Phosphatase (Aragon et al. 2001), Lipase A und B (LipA und B) (Aragon et al. 2002), Phospholipase A/Lysophospholipase (PlaA und PlaC) (Banerji et al. 2005; Bender et al. 2009; Schunder et al. 2010), RNase (Rossier et al. 2009) und Chitinase (DebRoy et al. 2006b).

Nach der Phagozytose der Legionellen befinden diese sich in einer Vakuole. Zur Verhinderung der Phagosom-Lysosom-Verschmelzung und für die weitere Beeinflussung der Wirtszelle sekretiert *Legionella* über das *dot/icm* T4BSS verschiedene Effektoren. Man vermutet bisher über 278 verschiedene Proteine, die durch *dot/icm* sekretiert werden und von denen viele redundante Funktionen haben (Campodonico et al. 2005; de Felipe et al. 2005; de Felipe et al. 2008; Burstein et al. 2009; Heidtman et al. 2009; Isberg et al. 2009; Zhu et al. 2011). Für den Aufbau der replikativen Vakuole sind zum Beispiel die Effektoren YlfA (Campodonico et al. 2005), LidA (Conover et al. 2003; Machner and Isberg 2006), RalF (Nagai et al. 2002), SidC (Weber et al. 2006), SidJ (Liu and Luo 2007), SidM (Machner and Isberg 2007), VipA, D und E beteiligt (Shohdy et al. 2005). Antiapoptotische Faktoren sind SdhA (Laguna et al. 2006) und SidF (Banga et al. 2007). Die nicht-lytische Freisetzung der Legionellen aus Protozoen wird durch LepA und LepB vermittelt (Chen et al. 2007).

Vor kurzem wurde ein weiterer *dot/icm*-assoziiierter Faktor SidK beschrieben. Dieser interagiert mit VatA, einer Schlüsselkomponente der Protonenpumpe der Wirtszelle. Dieses verhindert die ATP-Hydrolyse und somit die Ansäuerung der Vakuole, wodurch die Bakterien nicht lysiert werden und replizieren können (Xu et al. 2010).

1.8 Das bakterielle Chemotaxisssystem

Ein solches System dient Bakterien dazu bevorzugte Umweltbedingungen zu finden, um sich dann in Richtung der detektierten Lockstoffe zu bewegen. Ein Chemotaxisssystem wurde bereits bei vielen Bakterien wie *E. coli*, *Helicobacter* oder *Bacillus* beschrieben (Pratt and Kolter 1998; Rolig et al. 2011; Yssel et al. 2011). Dabei wird das Detektieren von Lockstoffen über verschiedene Rezeptoren und Aktivatoren mit dem Motorapparat der Flagelle verbunden. Die chemotaktische Antwort wird über einen 2-Komponenten Signalübertragungsweg vermittelt. Dabei spielen die Histidin-Kinase CheA und der Regulator CheY eine wichtige Rolle. Das Adaptorprotein CheW ist dabei mit CheA oder anderen zytoplasmatischen Rezeptoren assoziiert. Indem ein Ligand an die Rezeptoren bindet, kommt es zur Autophosphorylation von CheA. Die Phosphoryl-Gruppe des CheA wird zum CheY transferiert, welches anschließend in Richtung der Flagelle diffundiert und dort die Motorrotation moduliert. Eine Anpassung an dauerhafte Stimulation durch Lockstoffe wird durch die Methyltransferase CheR vermittelt (Abb. 9) (Kentner and Sourjik 2006; Hazelbauer et al. 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass *L. longbeachae* NSW150 die Gene *cheR*, *cheA*, *cheY* und zwei Homologe zu *cheW* besitzt. Weiterhin sind die flankierenden genomischen Bereiche zwischen *L. pneumophila* und *L. longbeachae* hoch konserviert. Es wurde vermutet, dass *L. pneumophila* das Chemotaxisssystem trotz Flagellensystem in der Evolution verloren hat (Cazalet et al. 2010).

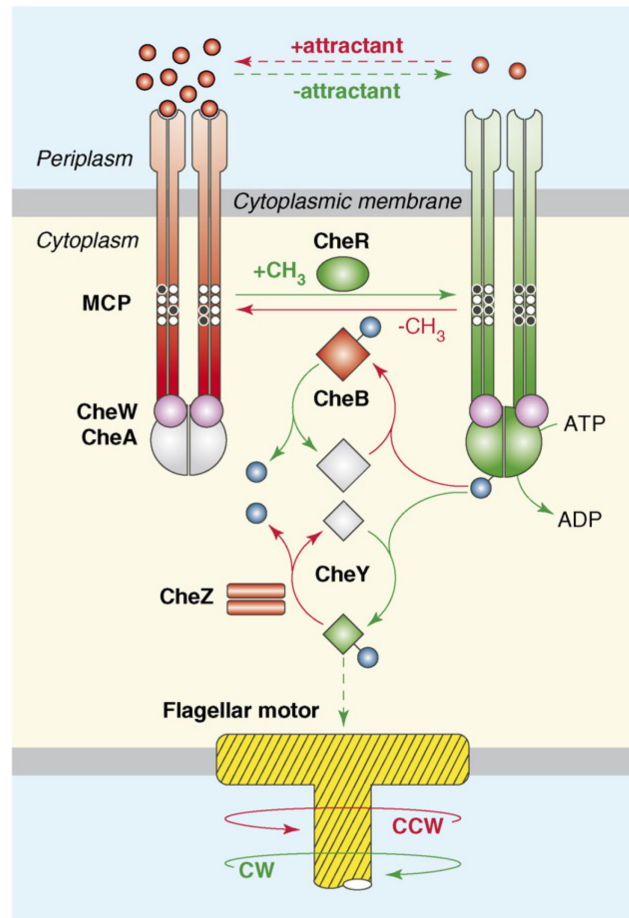


Abb. 9: Modell des Chemotaxisystems in *E. coli*. Lockstoffe werden durch Transmembranrezeptoren erkannt und über einen 2-Komponenten Signalübertragungsweg vermittelt. Die Histidin-Kinase CheA und das Adaptorprotein CheW sind mit den Rezeptoren assoziiert. Durch Autophosphorylation von CheA wird die Phosphoryl-Gruppe des CheA zu CheY transferiert. CheY diffundiert anschließend in Richtung der Flagelle und steuert dort die Motorrotation. CheR sorgt für eine Anpassung an eine dauerhafte Stimulation durch Lockstoffe. (Hazelbauer et al. 2008).

1.9 Der bakterielle Flagellenapparat

Das System des Flagellenapparates ist hochkonserviert und in verschiedenen Bakterien weit verbreitet. Die Unterschiede können darin bestehen wie groß die Anzahl der Flagellen pro Zelle ist, wo auf der Zelloberfläche sie sich befinden, aber auch aus welchen und wie vielen Proteinen sie bestehen (Penn and Luke 1992; Bardy et al. 2003). Dieses Kapitel soll einen kurzen Überblick über die evolutionäre Entstehung, die Funktion und den allgemeinen Aufbau der Flagelle geben.

1.9.1 Die evolutionäre Entstehung des Flagellenapparates

Es gibt viele Spekulationen über die Entstehung des Flagellensystems. Einige der Flagellenproteine haben große Homologien zu anderen biologischen Systemen (Pallen and Matzke 2006). Viele Ähnlichkeiten konnten dabei zwischen den Flagellengen und den Genen von Proteinsekretionssystemen gefunden werden. Besonders das Typ III Sekretionssystem ist dabei dem der Flagelle sehr ähnlich. Beide besitzen einen Basalkörper, welcher beide Membranen durchdringt. Allerdings konnten phylogenetische Untersuchungen zeigen, dass beide Systeme sich auf verschiedenen Ästen des phylogenetischen Baums befinden. T3SSs befinden sich meist auf mobilen Plasmiden und Pathogenitätsinseln und können durch horizontalen Gentransfer zwischen Gram-negativen Bakterien verbreitet werden (Groisman and Ochman 1996; Lee 1996). Flagellensysteme sind im Gegensatz dazu fast immer chromosomal kodiert, was nur eine vertikale Verbreitung zulässt (Nguyen et al. 2000). Zurzeit werden 3 Möglichkeiten zur Entstehung diskutiert. Es könnte sich entweder das Flagellensystem (Nguyen et al. 2000) oder das T3SS (Gophna et al. 2003) zuerst entwickelt haben. Die dritte Möglichkeit ist eine Ko-Entwicklung beider Systeme nebeneinander. Es ist aber allgemein anerkannt, dass beide der heutigen Systeme in irgendeiner Form einen gemeinsamen Vorläufer haben müssen (Saier 2004; Medini et al. 2006).

Innerhalb der verschiedenen Flagellensysteme kann man einen konservierten Kern von etwa 20 Proteinen definieren, den alle bakteriellen Flagellen miteinander teilen (Pallen and Matzke 2006). Zur Entstehung dieses Kerns gibt es kontroverse Meinungen, die einerseits horizontalen Gentransfer dafür verantwortlich machen (Doolittle and Zhaxybayeva 2007) oder die andererseits Genduplikationen einiger weniger Gene als Ursache sehen (Liu and Ochman 2007b).

Auch die Entstehung peritricher Flagellensysteme wurde bereits näher untersucht (Liu and Ochman 2007a). Dabei wird vermutet, dass laterale Flagellensysteme zweimal in der Evolution entstanden sind. Zum einen bei den α -Proteobakterien und zum anderen als gemeinsamer Vorfahre der β - und auch der γ -Proteobakterien zu denen *Legionella* gehört. Dort hat die genetische Grundlage der Flagelle bereits viele Veränderungen bezüglich der Anordnung und Organisation der Flagellengene durchlaufen. Vorläufer des Flagellensystems existierten wahrscheinlich nur als kleine Einheiten, die sich dann durch Einbeziehung neuer Gene und Genfusionen immer weiter über das gesamte Genom ausgebreitet haben. Dadurch

sind große Operone mit Flagellengenenen entstanden. Im Gegensatz dazu gibt es solche Operonstrukturen in α - und ε -Proteobakterien kaum.

1.9.2 Die Funktionen der Flagelle

Die wichtigste Funktion der Flagelle ist die Fortbewegung der Bakterien. Zusätzlich können sich Bakterien mit der Detektion von Umwelteinflüssen durch Chemotaxissysteme zielgerichtet zu günstigen Lebensbedingungen hin bewegen (siehe Kapitel 1.8) (Fenchel 2002). Im Weiteren ist die Flagelle bei der Adhäsion, der Biofilm-Formation oder der Kolonisierung beteiligt (Stanley 1983; Eaton et al. 1996; Gardel and Mekalanos 1996; Ciacci-Woolwine et al. 1998; Pratt and Kolter 1998; Danese et al. 2001).

Bei vielen pathogenen Bakterien wird die Flagelle auch als Virulenzfaktor bezeichnet (Ottemann and Miller 1997; Josenhans and Suerbaum 2002). So sind zum Beispiel viele *E. coli* Stämme peritrich lateral begeißelt. Es wird vermutet, dass die Flagellen den Kontakt zwischen Zelle und Oberfläche initiieren und für die Biofilm-Entstehung nötig sind (Pratt and Kolter 1998; Wood et al. 2006). Im Weiteren wurde gezeigt, dass die Flagelle für die Kolonisierung des Urinttrakts des Menschen durch uropathogene *E. coli* (UPEC) wichtig ist. Mittels Flagelle können sich die Bakterien durch den Urin und entlang der Mucus-Schicht bewegen um schließlich über Typ I Fimbrien an Rezeptoren der uroepithelialen Zellen zu adhären (Simms and Mobley 2008). UPEC können aber auch ohne Flagellen-vermittelte Motilität und Chemotaxis virulent sein. Allerdings steigern beide Faktoren die Fitness der Bakterien und somit die Pathogenität bei Infektionen (Wright et al. 2005; Lane et al. 2007).

Auch in *Campylobacter jejuni* ist die Flagelle ein wichtiger Virulenzfaktor. Dieser Auslöser von Diarrhö beim Menschen ist polar begeißelt. Die Flagelle ist im Wirt für die Kolonisierung wichtig und wird wahrscheinlich zusammen mit anderen Virulenzfaktoren reguliert (Carrillo et al. 2004; Gaynor et al. 2004). Außerdem werden über das Flagellensystem die Virulenzfaktoren, Cia (*Campylobacter invasion antigens*) Proteine genannt, sekretiert (Konkel et al. 2004).

Auch in *Yersinia enterocolitica* dient der Flagellenapparat selbst dem Transport von Virulenz-assoziierten Proteinen wie zum Beispiel die Phospholipase YplA (Young et al. 1999). Dabei ist der Transport dem des Typ III Sekretionssystems sehr ähnlich (siehe Kapitel 1.6.2).

Schließlich ist zu erwähnen, dass das Flagellin als ein Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) sehr starke antigene Eigenschaften hat und das Immunsystem in Tieren, Pflanzen und Menschen aktivieren kann (Dangl and Jones 2001; Hayashi et al. 2001; Smith and Ozinsky 2002; Hawn et al. 2003; Jones and Dangl 2006). Auf die Rolle der Flagelle von *Legionella* bei Infektionen des Menschen wird in Kapitel 1.10.5 näher eingegangen.

1.9.3 Der strukturelle Aufbau der Flagelle

Die bakterielle Flagelle ist ein hochkomplexes Organell aus verschiedenen Untereinheiten mit vielen Proteinen unterschiedlichster Funktionen. Sie besteht aus 3 großen Untereinheiten. Der Basalkörper ist in die Membranen integriert und durchdringt die Membranen und den periplasmatischen Raum. Daran schließt eine hakenartige Struktur an, die als *Hook* bezeichnet wird. Abschließend folgt das Filament mit dem Hauptbestandteil Flagellin (Macnab 2003; Pallen and Matzke 2006) (Abb. 10).

Mit dem Basalkörper assoziiert sind die Motorproteine. Der Motor der Flagelle besteht aus einem Rotor und einem Stator und wird durch Protonen und Natrium-Ionen angetrieben. Der Basalkörper besteht aus mehreren Proteinringen. Der zytoplasmatische C-Ring besteht aus FliM, FliN und FliG. FliM verbindet dabei durch Bindung mit dem Signalprotein CheY die Flagelle mit dem Chemotaxissystem. An den C-Ring anschließend folgen ein MS-Ring, ein P-Ring und ein L-Ring bis zum *Hook*. Der *Hook* dient als flexible Verbindung zwischen Basalkörper und Filament. Das Filament ist eine sehr lange helikale Struktur mit dem Hauptbestandteil Flagellin und einer *Cap*-Struktur aus FliD (Larsen et al. 1974; Manson et al. 1977; Hirota and Imae 1983; Dean et al. 1984; Jones et al. 1987; Blair and Berg 1988; Homma et al. 1990a; Homma et al. 1990b; Francis et al. 1994; Toker and Macnab 1997; Shimizu et al. 2003; Brown et al. 2007; Attmannspacher et al. 2008; Hizukuri et al. 2008).

Auch die Rotationsbewegungen unterscheiden sich zwischen verschiedenen Bakterien. Die Flagelle von *E. coli* kann mit und gegen den Uhrzeigersinn rotieren, aber auch pausieren (Lapidus et al. 1988). Weitere Arten haben dieselben Funktionen des Motors, andere dagegen nur 2 Varianten. Bei *Rhodobacter sphaeroides* kann die Flagelle nur in eine Richtung rotieren oder pausieren (Morehouse et al. 2005), während *Pseudomonas sp.* in beide Richtungen rotieren, aber nicht pausieren kann (Harwood et al. 1989).

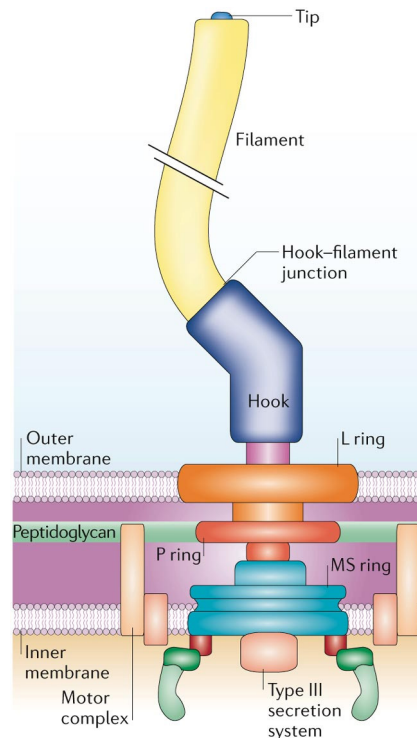


Abb. 10: Struktureller Aufbau des Flagellenapparates. Gezeigt ist der Basalkörper, der beide Membranen und den periplasmatischen Raum durchdringt. Der Basalkörper besteht aus C-Ring, MS-Ring, P-Ring und L-Ring und bildet eine tubuläre Struktur. Daran anschließend folgt der *Hook*, eine hakenartige, flexible Struktur, die den Basalkörper mit dem Filament verbindet. Das Filament besteht hauptsächlich aus der Untereinheit Flagellin und kann sehr lang werden (mehrere μm) (Pallen and Matzke 2006).

1.9.4 Der regulierte Zusammenbau der Flagelle

Sowohl die Synthese des Flagellenapparates als auch die Flagellenrotation bedarf sehr viel Energie. Aus diesem Grund ist die Bildung der Flagelle stark reguliert und an verschiedene Umweltregulatoren gekoppelt. Durch ein hierarchisches regulatorisches Netzwerk wird ein gesteuerter und kontrollierter Aufbau der Flagelle möglich. Im Weiteren wird durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen ein geordneter Aufbau der einzelnen Bestandteile der Flagelle gewährleistet. Zwischen verschiedenen Bakterien gibt es viele Unterschiede in diesem Regulationsprogramm. Allen gleich ist jedoch eine Klassifizierung der Gene im Hinblick auf ihre zeitliche Expression und Abhängigkeit von verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Peritriche Flagellensysteme haben häufig eine 3-stufige Regulationskaskade mit den Hauptregulatoren FlhD und FlhC (Soutourina and Bertin

2003). Polare Flagellensysteme sind meist 4-stufig aufgebaut und die Transkription der Flagellengene wird meist durch *enhancer binding* Proteine zusammen mit der RNA Polymerase und dem σ^{54} Faktor RpoN gesteuert (Jacobi et al. 2004; Albert-Weissenberger et al. 2010). Die Hauptregulatoren beider Flagellensysteme regulieren meist auch weitere Gene, die in keinem direkten Zusammenhang mit dem Flagellensystem zu stehen (Hickman and Harwood 2008).

Bei den peritrich flagellierten *E. coli* wird die Expression der Hauptregulatoren der Flagelle FlhD und FlhC durch verschiedene Regulatoren gesteuert (Aizawa and Kubori 1998). Zu denen gehört unter anderem CsrA (Wei et al. 2001). Beide Proteine steuern nahezu die gesamte Flagellenkaskade indem sie zuerst zusammen mit σ^{70} die Transkription einiger Flagellengene induzieren. Zu diesen Genen gehört auch der σ^{28} Faktor *fliA*. Anschließend induzieren FlhD und FlhC zusammen mit FliA weitere Flagellengene (Liu and Matsumura 1994). Abschließend induziert FliA noch einige Gene unabhängig von FlhD und FlhC (Liu and Matsumura 1995).

In *Pseudomonas aeruginosa*, einem lophotrichen γ -Proteobakterium, ist das *enhancer binding protein* FleQ als Klasse I Gen der Hauptregulator des Flagellenregulons. Die Expression von FleQ wird über σ^{70} aktiviert und durch Vfr reprimiert (Dasgupta et al. 2002). Direkt oder indirekt steuert FleQ die Mehrheit aller Flagellengene. Der alternative σ^{28} Faktor FliA wird nicht durch FleQ reguliert. Dessen Transkription ist vermutlich konstitutiv und nicht abhängig von Regulatoren des Flagellensystems (Dasgupta et al. 2002; Dasgupta et al. 2003). Klasse II Gene werden direkt durch FleQ und den σ^{54} Faktor RpoN induziert. Die Aktivität von FleQ wird dabei posttranskriptionell durch eine Rückkopplungsschleife mit FleN kontrolliert (Dasgupta et al. 2000; Dasgupta and Ramphal 2001). Durch Aktivierung von FleR durch die Sensorkinase FleS (Klasse II Gene) können FleR und RpoN zusammen die Klasse III Genexpression induzieren (Ritchings et al. 1995; Dasgupta et al. 2003). Schließlich induziert FliA die Expression der Klasse IV Gene zu denen auch das Flagellin gehört (Frisk et al. 2002; Buck et al. 2006).

Im ϵ -Proteobakterium *Helicobacter pylori* (lophotriche Flagelle) verläuft die Flagellenkaskade sehr ähnlich. Allerdings wurde hier kein Hauptregulator identifiziert. Die Expression der frühen Flagellengene ist vermutlich konstitutiv (Niehus et al. 2002; Niehus et al. 2004). Auch hier kontrollieren ein 2-Komponentensystem aus FlgR und FlgS zusammen mit RpoN (σ^{54}) die Expression der Klasse II Gene (Brahmachary et al. 2004; Pereira et al.

2006). Ein σ^{28} Faktor aktiviert die Expression der späten Klasse IV Gene und steuert vermutlich auch die Expression der Klasse III Gene (Ye et al. 2007).

1.10 Die Expression der Flagelle in *L. pneumophila*

Nachdem der Flagellenapparat im Allgemeinen beschrieben wurde, soll nachfolgend die Flagelle von *Legionella pneumophila* im Speziellen erläutert werden. Vielen der bisher gewonnenen Erkenntnisse können auch auf diese Spezies übertragen werden.

1.10.1 Die Gene und Proteine der Flagelle

Zum Flagellenregulon von *L. pneumophila* gehören 47 Gene, die in 11 Operonen organisiert sind. Dazu gehören Gene für die Regulation, für den strukturellen Aufbau und für den Motor des Flagellenapparates. Basierend auf der zeitlichen Expression der Gene können diese in 4 Klassen eingestuft werden (Jacobi et al. 2004; Heuner and Albert-Weissenberger 2008; Albert-Weissenberger et al. 2010) (Tab. 4).

Tab. 4: Flagellen-assoziierte Gene von *L. pneumophila*, deren Funktion und Einteilung in Klassen der Expressionsstufe (Albert-Weissenberger et al. 2010).

Genname	Funktion	Klasse
<i>rpoN</i>	σ^{54} Faktor	I
<i>fleQ</i>	Hauptregulator FleQ	I
<i>fleS, fleR</i>	2-Komponentensystem	IIa
<i>fliMN</i>	Motor-Switch-Protein	IIa
<i>fliFJIHG</i>	Basalkörper	IIa
<i>flgABCDFGHIJ</i>	Basalkörper	IIb
<i>flhAB, fliRQPO</i>	Flagellensynthese	IIa
<i>fliE</i>	Hook	IIa
<i>flgEK, fliKK2</i>	Hook	IIb
<i>fleN, flhF</i>	Flagellensynthese	IIb

<i>motA, motB, motA2, motB2</i>	Motorproteine	III
<i>fliA</i>	Alternativer σ^{28} Faktor	(III) [#]
<i>flgM</i>	Anti- σ^{28} Faktor	IV
<i>flhB2</i>	Putativer Export von Flagellenproteinen	IV
<i>flgNL, motY, flaG</i>	unbekannt	IV
<i>fliSD</i>	Filament	IV
<i>flaA</i>	Flagellin, Hauptbestandteil des Filaments	IV

[#] bei Jacobi und Kollegen im Stamm *Lp* Corby als eigenständiges Gen beschrieben (Jacobi et al. 2004)

1.10.2 Die Regulation der Flagellenexpression

Die Flagellierung von *Legionella* ist abhängig vom Lebenszyklus. Der Eintritt in die transmissive Phase wird initiiert durch veränderte Umweltbedingungen zum Beispiel der Mangel an Aminosäuren oder der Überschuß von Fettsäuren. Nähere Einzelheiten wurden bereits in Kapitel 1.5.4 besprochen. Es gibt verschiedene Modelle für die Genexpression der Flagelle in *Legionella* (Heuner and Steinert 2003; Jacobi et al. 2004; Brüggemann et al. 2006; Cazalet et al. 2008b; Albert-Weissenberger et al. 2010). Aufgrund der Homologie der Regulatoren FleS/FleR, FleQ, RpoN und FliA zu *P. aeruginosa* (siehe Kapitel 1.9.4) wird ein ähnlicher Aufbau bei *Legionella* vermutet (Kapitel 1.10.3).

1.10.3 Der kaskadenartige Aufbau des Flagellenregulons

Die Flagellenkaskade von *L. pneumophila* wird seit einigen Jahren besonders in den Stämmen Paris und Corby intensiv untersucht. Zwischen den Stämmen konnten viele Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede gefunden werden. Der allgemeine Aufbau wird in dieser Arbeit anhand von *Lp* Corby beschrieben. Weiterhin sollen Unterschiede zum Stamm *Lp* Paris gezeigt werden. Im Folgenden soll das aktuelle Modell des Flagellenregulons anhand zweier Schemata aus *Lp* Corby bzw. Paris näher beschrieben werden (Abb. 11 bzw. Abb. 12).

Der σ^{54} Faktor RpoN kann zusammen mit *enhancer binding* Proteinen die Transkription von Genen initiieren (Wigneshweraraj et al. 2008). In *Legionella* sind bisher 3 putative *enhancer binding* Proteine bekannt, FleQ, FleR und PilR (Jacobi et al. 2004). Vor kurzem

wurde gezeigt, dass in *Legionella* durch FleQ und RpoN zusammen ausschließlich Gene des Flagellenregulons aktiviert werden (Albert-Weissenberger et al. 2010). Ähnlich wie in *P. aeruginosa* aktivieren diese beiden Faktoren die Klasse II Gene der Flagelle (Dasgupta et al. 2003). Dazu gehören hauptsächlich die Bestandteile des Basalkörpers (Tab. 4). Ähnlich wie in *P. aeruginosa* beschrieben, aktiviert in *Lp* Corby FleQ zusammen mit RpoN die Klasse III und IV Gene (Abb. 11). Im Stamm *Lp* Corby wird *fliA* nicht zu den Klasse III Genen gezählt, sondern steht vermutlich eigenständig (Heuner and Albert-Weissenberger 2008). Durch die Transkription von σ^{28} Faktor *fliA* werden schließlich die Klasse IV Gene exprimiert (Heuner et al. 1995; Heuner et al. 1997; Heuner et al. 2002). Zu diesen gehören wichtige Strukturproteine wie das Flagellin (FlaA) und die Motorproteine. Es wird vermutet, dass RpoN zusammen mit FleR eine Art negative Rückkopplungsschleife bildet, die nicht mehr benötigte Flagellengene wieder abschaltet (Albert-Weissenberger et al. 2010). Somit wurde gezeigt, dass FleQ der Hauptregulator der Flagellenbiosynthese ist und zusammen mit RpoN, aber auch RpoN-unabhängig die Expression der Flagellengene reguliert. Der Transkription von FleQ wird vermutlich durch σ^{70} RpoD reguliert (Jacobi et al. 2004). Weiterhin wurde das Gen *flaR* als möglicher Repressor der *flaA* Expression beschrieben (Heuner et al. 2000).

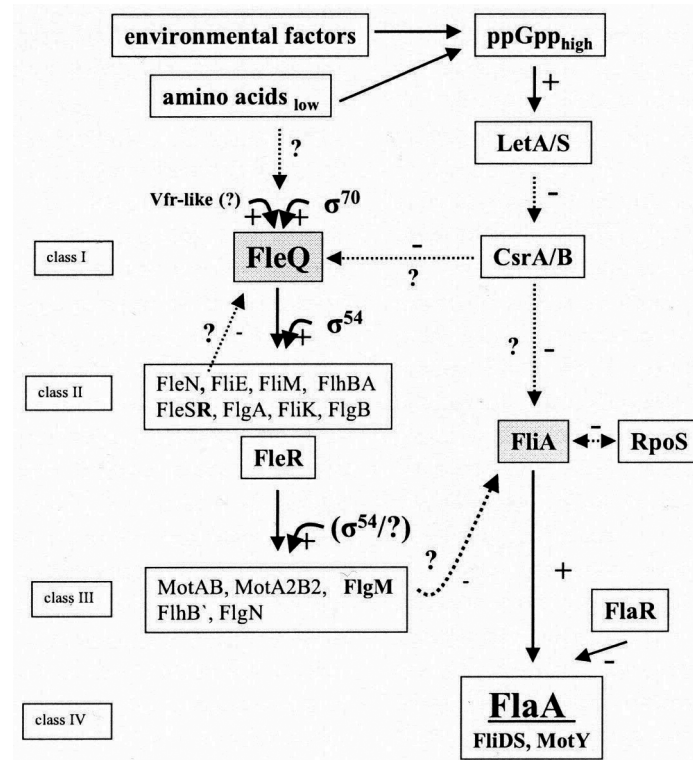


Abb. 11: Aufbau der Regulationskaskade der Flagelle von *L. pneumophila* Corby. Umwelteinflüsse und Mangel an Aminosäuren und Fettsäuren sind Auslöser für den Übergang in die transmissive Phase. Die Expression der Flagellengene erfolgt zeitlich reguliert (Klasse I-IV). Die Expression von FleQ ist wahrscheinlich durch σ^{70} Faktor RpoD reguliert. Anschließend regulieren FleQ und RpoN die Expression der Klasse II Gene des Flagellenregulons gemeinsam. RpoN steuert die Expression der Klasse III Gene. Der σ^{28} Faktor FliA wird in *Lp* Corby vermutlich durch CsrA und/oder RpoS reguliert. FliA steuert abschließend die Expression der Klasse IV Gene für die Vervollständigung der Flagelle. FlaR ist ein möglicher Repressor der Flagellin-Expression. FleR und RpoN bilden möglicherweise eine negative Rückkopplungsschleife auf die Flagellengene (Heuner and Albert-Weissenberger 2008).

Vor kurzem wurde der Stamm *L. pneumophila* Paris und die Mutantenstämme $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta fleR$ und $\Delta fliA$ mit Hilfe von Microarray-Experimenten untersucht (Brüggemann et al. 2006; Albert-Weissenberger et al. 2010). Unterschiede zu *Lp* Corby zeigten sich besonders bei der Regulation von FliA. Während im Stamm Corby FliA wahrscheinlich FleQ-unabhängig reguliert wird (Jacobi et al. 2004), ist FleQ wichtig für die FliA Expression in *Lp* Paris (Heuner and Albert-Weissenberger 2008; Albert-Weissenberger et al. 2010) (Abb. 12). Im Gegensatz zu *Lp* Corby werden im Stamm Paris die Klasse III und IV Gene durch FleQ unabhängig von RpoN aktiviert (Albert-Weissenberger et al. 2010).

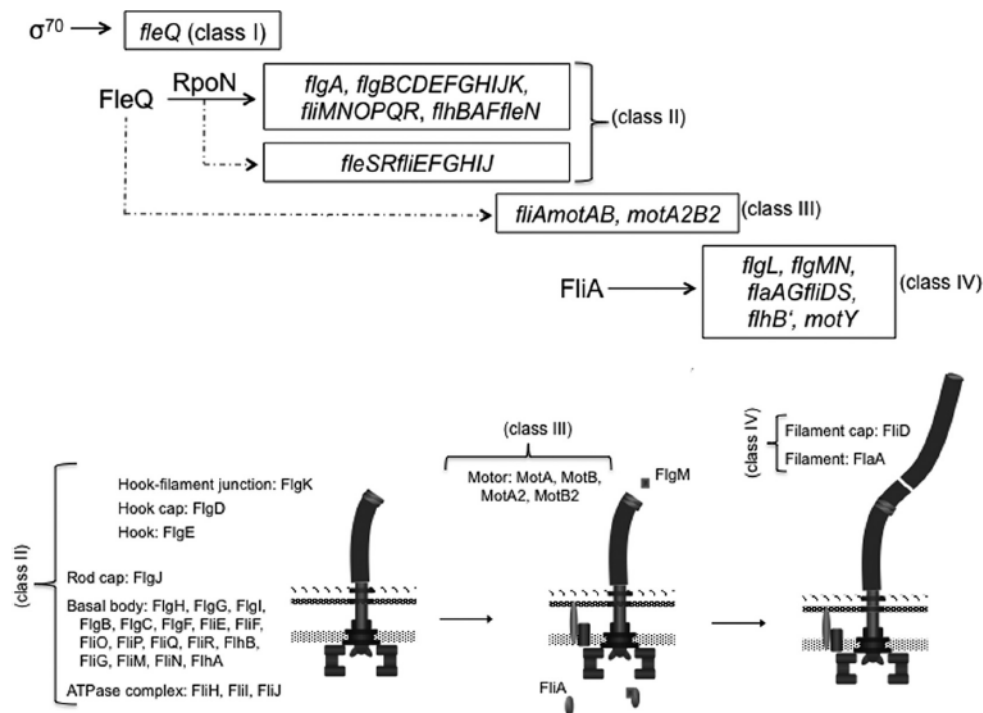


Abb. 12: Aufbau der Regulationskaskade der Flagelle von *L. pneumophila* Paris. Die Expression der Flagellengene erfolgt zeitlich reguliert (Klasse I-IV). Die Expression von FleQ ist wahrscheinlich durch σ^{70} Faktor RpoD reguliert. FleQ und RpoN regulieren wie bei *Lp* Corby die Expression der Klasse II Gene des Flagellenregulons. Unabhängig von RpoN steuert FleQ im Weiteren die Expression der Klasse III Gene, einschließlich *fliA*. Der σ^{28} Faktor FliA steuert abschließend die Expression der Klasse IV Gene für die Vervollständigung der Flagelle (Albert-Weissenberger et al. 2010).

Eine RpoN-unabhängige Aktivierung durch FleQ durch Bindung an zyklisches dimeres GMP (c-di-GMP) wurde vor kurzem in *P. aeruginosa* gezeigt (Hickman and Harwood 2008). Möglicherweise können die DNA-bindenden Eigenschaften von FleQ durch c-di-GMP gesteigert werden. *Legionella* besitzt viele Proteine mit GGDEF und/oder EAL Domänen, welche die Konzentration von c-di-GMP kontrollieren (Brüggemann et al. 2006). Die GGDEF Domäne sorgt für die Synthese von c-di-GMP aus GTP, während eine EAL Domäne die Funktion einer Diguanylat-Phosphodiesterase besitzt und c-di-GMP zu GMP degradiert. PAS/PAC Domänen dienen als Signal-Sensoren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem ein solches Protein näher untersucht. Dieses wurde zuvor als FliA-abhängiges Protein beschrieben.

1.10.4 Die Flagelle und Virulenz

Die Entstehung des Flagellenapparates korreliert in *Legionella* mit der Ausbildung eines virulenten Phänotyps in der transmissiven Phase (Bosshardt et al. 1997; Byrne and Swanson 1998; Hammer and Swanson 1999; Heuner et al. 2002). Es wurde gezeigt, dass nicht-flagellierte Insertionsmutanten sich in Amöben und humanen Monozyten-ähnlichen Zellen schlechter vermehren können (Pruckler et al. 1995). Im Weiteren wurde eine Attenuation von Flagellin-defizienten Legionellen in eukaryotischen Zellen beobachtet (Dietrich et al. 2001). Dabei wurde gezeigt, dass die Invasionsfähigkeit vermindert war, während die intrazelluläre Vermehrung nicht beeinflusst wurde. Allerdings ist es möglich, dass nicht die Flagelle der ausschlaggebende Faktor für diesen Phänotyp ist, sondern die Motilität der Bakterien. Ein wichtiges Argument dafür sind Studien mit einer $\Delta motAB$ Mutante in *Legionella*, bei der ein ähnlicher Phänotyp beobachtet wurde (Molofsky et al. 2005). Auch hier konnte eine Attenuation der Mutante beim Zellkontakt gezeigt werden, während die intrazelluläre Replikation unverändert blieb.

Weiterhin wurde bereits festgestellt, dass der zentrale Regulator des Flagellings, FliA, Auswirkungen auf die Virulenz von *L. pneumophila* hat. Für FliA wurden verschiedene Funktionen beschrieben wie zum Beispiel die Steigerung der Infektiosität und intrazellulären Replikation (Hammer et al. 2002; Heuner et al. 2002), der Zytotoxizität (Hammer et al. 2002; Molofsky et al. 2005) und der Biofilm-Bildung (Mampel et al. 2006). FliA reguliert außerdem die Bildung des Melanin-ähnlichen Pigments von *Legionella* zum Schutz vor UV-Strahlung (Molofsky et al. 2005).

Neben FliA beeinflusst auch das 2-Komponentensystem FleS/FleR die Virulenz von *L. pneumophila*. So wurde gezeigt, dass Mutationen in diesem Bereich für geringere Invasionsraten bei Amöbeninfektionen verantwortlich sind (Polesky et al. 2001).

Aus anderen Bakterienarten weiß man bereits, dass verschiedenste virulenz-assoziierte Faktoren durch den Flagellenapparat transportiert werden können. Beispiele dafür sind die Phospholipase YplA aus *Yersinia enterocolitica* oder das Hämolyisin BL aus *Bacillus thuringiensis* (Young et al. 1999; Ghelardi et al. 2002). Inwieweit dies auch auf *Legionella* zutrifft, konnte bisher noch nicht beantwortet werden. Aufgrund der allgemeinen Verbreitung bei verschiedenen Bakterienarten ist es aber wahrscheinlich, dass auch *Legionella* diesen Sekretionsweg nutzt.

1.10.5 Die Flagelle in tierischen und humanen Wirtszellen

Wie zuvor erwähnt hat das Flagellin-Protein von *Legionella* stark antigene Eigenschaften. Das bedeutet, dass aufgrund des Flagellins das Immunsystem des Wirts aktiviert werden kann und somit eine Abwehrreaktion gegen die infizierenden Bakterien beginnt. Erstmals beobachtet wurde dies in Infektionsversuchen mit primären Knochenmarksmakrophagen aus Mäusen (Yamamoto et al. 1988a; Yamamoto et al. 1988b). Dabei wurde gezeigt, dass sich Legionellen in verschiedenen Mausstämmen unterschiedlich stark vermehren können (Abb. 13).

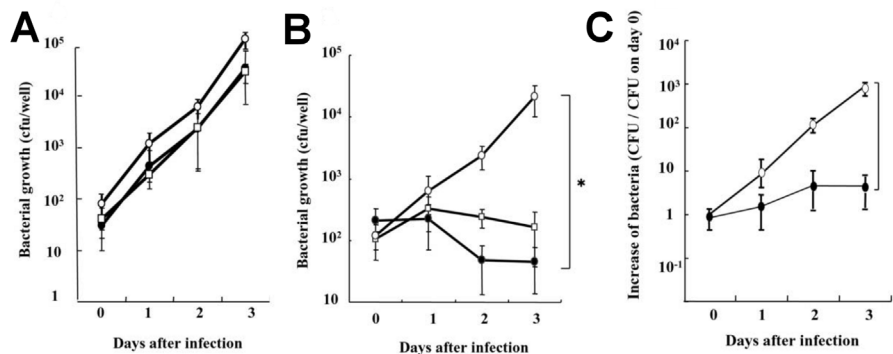


Abb. 13: Intrazelluläres Wachstum von Flagellin-defizienten *L. pneumophila* Stämmen in primären Knochenmarksmakrophagen (BMMs) aus (A) A/J, (B) CL57BL/6 und (C) BALB/c Mäusen. BMMs wurden infiziert mit *L. pneumophila* Corby (LpC) Wildtyp und den Mutanten LpC $\Delta flaA$ und $\Delta fliA$. Der wildtypische Stamm kann sich nur in BMMs aus A/J Mäusen vermehren, während LpC $\Delta flaA$ sich sowohl in wildtypischen Mausmakrophagen (CL57BL/6 und BALB/c) als auch in Naip5-defizienten BMMs (A/J) vermehren kann (Akamine et al. 2007). Symbole: schwarzer Kreis (●), LpC Wildtyp; weißer Kreis (○), LpC $\Delta flaA$ Mutante; weißes Quadrat (□), LpC $\Delta fliA$ Mutante; Stern (*), $P < 0,05$.

Als Ursache für diese unterschiedliche Vermehrung wurde der zytosolische Wirtsrezeptor Naip5 (*neuronal apoptosis inhibitory protein 5*) identifiziert, der in A/J Mäusen mutiert ist (Diez et al. 2003). Dieser soll im Zytosol der Wirtszelle Flagellin, welches durch das Typ IVB Sekretionssystem (T4BSS) in die Zelle gelangt ist, detektieren (Sexton and Vogel 2002). Während der Phagozytose bildet *Legionella* durch das T4BSS Poren in der Membran der Makrophagen. Es wird vermutet, dass dabei entweder extrazelluläres Flagellin oder Flagellin aus dem Zytosol der Bakterien in die Wirtszelle gelangt (Molofsky et al. 2006). Auch in humanen Makrophagen kann man einen Naip-Rezeptor mit ähnlicher Funktion finden (Vinzing et al. 2008).

Im Zytosol von humanen Zellen gibt es noch weitere Rezeptoren, die bakterielles Flagellin binden können. Dazu gehört der Rezeptor IPAF/Nlrc4 (Mariathasan et al. 2004; Amer et al. 2006). Naip und IPAF besitzen verschiedene Domänen wie zum Beispiel CARD- (*caspase-recruitment domain*), NOD- (*nucleotide-binding oligomerization domain*) und LRR- (*leucine-rich repeat*) Domänen und reagieren als Heterodimer. Flagellin wird dabei durch die LRR-Domänen gebunden und durch die CARD-Domäne wird die Caspase-1 aktiviert. Diese spaltet anschließend pro-IL-1 β , pro-IL-18 und pro-Caspase-7 (Sutterwala and Flavell 2009). Dadurch kommt es zur Ausschüttung von IL-1 β und IL-18. Die inflammatorische Immunreaktion der Wirtszelle wird aktiviert und schließlich kommt es zur Apoptose (Case et al. 2009; Abdelaziz et al. 2010).

Neben dieser intrazellulären Erkennung von Flagellin durch die Wirtszelle besitzen humane Makrophagen auch membrangebundene extrazelluläre Flagellinrezeptoren wie TLR5 (*toll-like receptor 5*). Dieser erkennt spezifisch bakterielles Flagellin. Ähnlich wie TLR2, welcher bakterielles Peptidoglycan und Lipopeptide erkennt, aktiviert TLR5 über das Adaptorprotein MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) die Ausschüttung von IL-12, IFN- γ und NF κ B (Hayashi et al. 2001; Hawn et al. 2003; Iwasaki and Medzhitov 2004). Ein Modell der verschiedenen Interaktionen der Rezeptoren mit bakteriellem Flagellin und die folgenden inflammatorischen Reaktion sind in Abb. 14 zusammenfassend dargestellt.

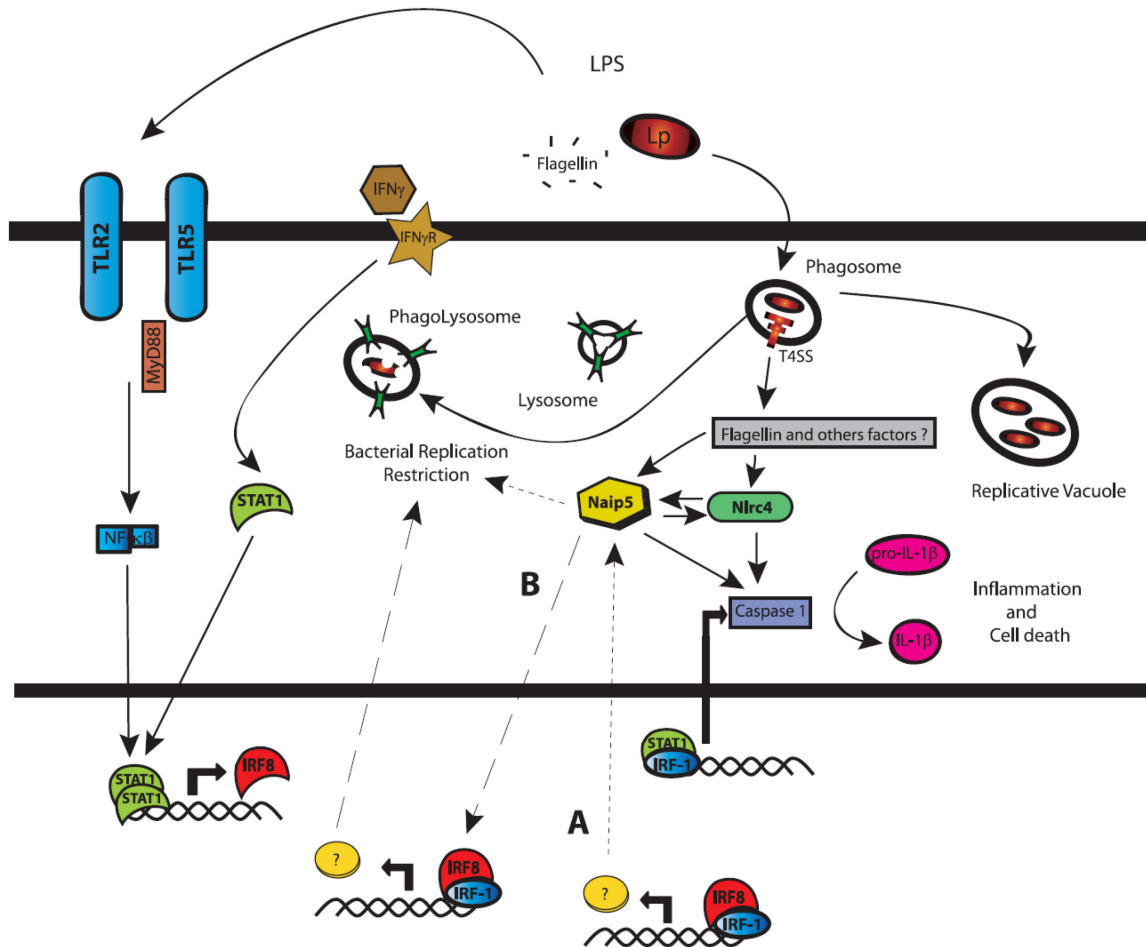


Abb. 14: Modell für die Erkennung von bakteriellem Flagellin in humanen Makrophagen. Flagellin kann über extrazelluläre Rezeptoren (TLR5) oder zytosolische Rezeptoren (Naip5 und IPAF/Nlr4) erkannt werden. Bei Naip5/IPAF kommt es zur Aktivierung von Caspase-1, welches wiederum verschiedene Interleukine spalten kann. Dadurch kommt es zur Ausschüttung von IL-1β und IL-18 und zur Inflammation mit dem abschließenden Tod der Zelle. TLR5 aktiviert über das Adaptorprotein MyD88 die Ausschüttung von IL-12, IFN-γ und NFκβ was ebenfalls eine inflammatorische Reaktion zur Folge hat (Fortier et al. 2009). Abkürzungen: LPS, Lipopolysaccharid; *Lp*, *L. pneumophila*; MyD88, *myeloid differentiation primary response gene 88*; IFNγR, IFN-γ Rezeptor; T4SS, Type IV Sekretionssystem; TLR, Toll-like Rezeptor; Naip5, *neuronal anti-apoptotic inhibitor protein 5*; Nlr4 (IPAF), *Nod-like Rezeptor, CARD domain-containing 4*; STAT, *signal transducer and activator of transcription*.

1.11 Ziele der Arbeit

Zunächst sollte die Bedeutung der wichtigsten Regulatoren des Flagellen-Regulons, RpoN, FleQ und FliA, für das Infektionsverhalten von *Legionella pneumophila* mit Hilfe eines neuen Replikations-/ Überlebensassay untersucht werden. Dabei sollte der Vergleich zwischen den Stämmen *Lp* Corby und Paris stammspezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten herausstellen.

Weiterhin zeigten frühere Studien widersprüchliche Daten zur Expression dieser Faktoren. In Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb Daten über die wachstumsabhängige Expression von RpoN, FleQ, FliA und FlaA auf RNA- und Proteinebene erhoben werden.

FliA ist der wichtigste Regulator des Flagellins (FlaA). Trotzdem gab es bisher nur wenige Informationen zur Regulation dieses Sigmafaktors. Hier sollten Daten zur Expression gesammelt werden. Zusätzlich sollte der Transkriptionsstart im *Lp* Corby Wildtyp und verschiedenen Mutanten bestimmt werden. Neben den Veränderungen in Deletionsmutanten in Bezug auf die Transkription und Translation verschiedener Faktoren sollten auch morphologische Veränderungen der Flagelle mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht werden.

In den letzten Jahren sind Untersuchungen auf Genomebene immer wichtiger geworden. Für diese Arbeit sollten Genome verschiedener *Legionella* Arten sequenziert und mit den bestehenden Daten in Bezug auf das Flagellensystem und ein neu entdecktes, putatives Chemotaxissystem näher untersucht werden.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , Ω 80 Δ lacZ Δ 15, Δ (<i>argF lac</i>), U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (rk ⁻ , mk ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA69</i> , <i>relA1</i> λ -	(Hanahan 1983)
<i>L. pneumophila</i> Corby (LpC) Wt	Phänotyp: WT; Patientenisolat; hochvirulent	(Jepras et al. 1985; Glöckner et al. 2008)
LpC Δ <i>fleQ</i> KH3	Δ <i>fleQ</i> Mutante; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 3	Klaus Heuner, Berlin (Jacobi et al. 2004)
LpC Δ <i>fleQ</i> KH14	Δ <i>fleQ</i> Mutante; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 14	Klaus Heuner, Berlin (Jacobi et al. 2004)
LpC Δ <i>rpoN</i> SJ21	Δ <i>rpoN</i> Mutante; Deletion von 490 bp; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 21	Sebastian Jacobi, Würzburg (Jacobi et al. 2004)
LpC Δ <i>rpoN</i> SJ25	Δ <i>rpoN</i> Mutante; Deletion von 490 bp; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 25	Sebastian Jacobi, Würzburg (Jacobi et al. 2004)
LpC Δ <i>fliA</i> KH2	Δ <i>fliA</i> Mutante; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 2	Klaus Heuner, Berlin (Heuner et al. 2002)
LpC Δ <i>fliA</i> KH12	Δ <i>fliA</i> Mutante; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 12	Klaus Heuner, Berlin (Heuner et al. 2002)
LpC Δ <i>flaA</i> ES6	Δ <i>flaA</i> Mutante; Deletion von Gen <i>flaA</i> ; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 6	Eva Schunder, Berlin (Schulz et al. 2012)
LpC Δ <i>lpc2402</i> TS A6 bis A11	Δ <i>lpc2402</i> Mutante aus pTS3#4; Deletion von Gen <i>lpc2402</i> ; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 6 bis 11	Diese Arbeit (Schulz et al. 2012)
LpC Δ <i>lpc2402</i> TS B4 bis B10	Δ <i>lpc2402</i> Mutante aus pTS3#8; Deletion von Gen <i>lpc2402</i> ; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 4 bis B10	Diese Arbeit
LpC Δ <i>fliD</i> TS1; 2; 4; 5 und 8	Δ <i>fliD</i> Mutante aus pGEM- Δ <i>fliD</i> -gent; Insertion von Gm ^r -Kassette in Gen <i>fliD</i> ; Klon 1, 2, 4, 5, 8	Diese Arbeit (Schulz et al. 2012)
<i>L. pneumophila</i> Paris (LpP) Wt	Phänotyp: WT; Patientenisolat; hochvirulent	Institut Pasteur, Paris, (Cazalet et al. 2004)
LpP Δ <i>fleQ</i> ChA15 und 20	Δ <i>fleQ</i> Mutante; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 15 und 20	Christiane Albert-Weissenberger, Würzburg (Albert-Weissenberger et al. 2010)
LpP Δ <i>rpoN</i> ChA2	Δ <i>rpoN</i> Mutante; Deletion von 490 bp; Insertion von Km ^r -Kassette; Klon 2	Christiane Albert-Weissenberger, Würzburg (Albert-Weissenberger et

LpP Δ <i>fliA</i>	Δ <i>fliA</i> Mutante; Insertion von Km ^r -Kassette	al. 2010) Holger Brüggemann, Paris (Brüggemann et al. 2006)
<i>L. pneumophila</i> Lens (LpL)	Nur Online-Sequenz verwendet; www.pubmed.org	Institut Pasteur, Paris (Cazalet et al. 2004)
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia I (LpPhil)	Phänotyp: WT; Patientenisolat; hochvirulent	(Fraser et al. 1977; Chien et al. 2004)
Lp02 Δ <i>letA</i>	Δ <i>letA</i> ; Insertion von Km ^r -Kassette in <i>letA</i> Gen vom Stamm Lp02 (Subspezies von <i>Lp</i> Philadelphia I)	(Hammer et al. 2002)
<i>L. pneumophila</i> Alcoy (LpAlc)	Nur Online-Sequenz verwendet; www.pubmed.org	(Fernandez et al. 2002; D'Auria et al. 2010)
<i>L. pneumophila</i> Togus-1 (LpTogus)	Genom-Sequenzierung: Diese Arbeit	C. Lück, Dresden (Brenner et al. 1979)
LLAP10	Genom-Sequenzierung: C. Buchrieser, Institut Pasteur, Paris	C. Buchrieser, Institut Pasteur, Paris ; (Birtles et al. 1996)
<i>L. drancourtii</i> LLAP12	Nur Online-Sequenz verwendet; www.pubmed.org	Moliner, 2009, www.pubmed.org; (Fallon and Rowbotham 1990)
<i>L. micdadei</i> (Lmic)	Genom-Sequenzierung: C. Buchrieser, Institut Pasteur, Paris	C. Buchrieser, Institut Pasteur, Paris ; (Brenner et al. 1979)
<i>L. hackelia</i> (Lhack)	Genom-Sequenzierung: C. Buchrieser, Institut Pasteur, Paris	C. Buchrieser, Institut Pasteur, Paris ; (Brenner et al. 1979)
<i>L. bozemanii</i> (Lboze)	Genom-Sequenzierung: Diese Arbeit	(Brenner 1980)
<i>L. gormanii</i> (Lgorm)	Genom-Sequenzierung: Diese Arbeit	(Morris et al. 1980)
<i>L. lytica</i> (Llyti)	Genom-Sequenzierung: Diese Arbeit	(Springer et al. 1992)
<i>L. longbeachae</i> NSW150 (Llong)	Genom-Sequenzierung: C. Buchrieser, Institut Pasteur, Paris	(McKinney et al. 1981; Cazalet et al. 2010)
<i>L. oakgridgensis</i> (Loak)	Genom-Sequenzierung: Diese Arbeit	(Orrison et al. 1983)

2.2 Amöben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Amöben *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30234) verwendet (Moffat and Tompkins 1992). Diese wurden in PYG-Medium kultiviert (siehe Kapitel 3.1.3).

2.3 Vektorkarte pGEM T Easy

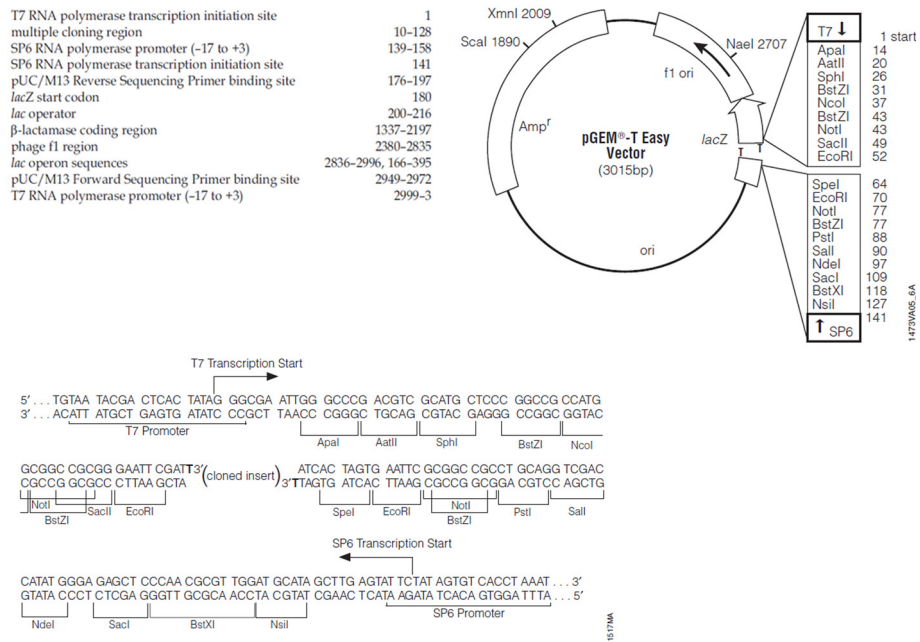


Abb. 15: Vektorkarte von pGEM Teasy (Promega)

2.4 Plasmide

Tab. 6: In dieser Arbeit zum Klonieren verwendete rekombinante Plasmide mit Charakteristika und Referenz. Abkürzungen: Amp^r, Ampicillin-Resistenz; Km^r, Kanamycin-Resistenz; Gm^r, Gentamycin-Resistenz.

Bezeichnung	Vektor	Charakteristika	Referenz
pChA12	pGEM TEasy	Km ^r -Kassette; amplifiziert mit Km ^r -XbaI-U und Km ^r -XbaI-R; Insert: 1.400 bp, kann mit <i>XbaI</i> ausgeschnitten werden; Amp ^r , Km ^r	C. Albert-Weissenberger
pTS1	pGEM TEasy	pGEM-T Easy; kodierende Region von <i>lpc2402</i> und flankierende Bereiche mit jeweils 1.000 bp; Ap ^r	Diese Arbeit
pTS2#4 und 8	pGEM TEasy	pTS1; Deletion der kodierenden Region von <i>lpc2402</i> mit verbleibenden flankierenden Bereichen; Klon 4 und 8; Ap ^r	Diese Arbeit
pTS3#4	pGEM TEasy	pTS2#4 mit Insertion einer 1,4 kb großen Km ^r -Kassette aus pChA12 zwischen die flankierenden Bereiche von <i>lpc2402</i> ; Amp ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pTS3#8	pGEM TEasy	pTS2#8 mit Insertion einer 1,4 kb großen Km ^r -Kassette aus pChA12 zwischen die flankierenden Bereiche von <i>lpc2402</i> ; Amp ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pGEM- Δ <i>fliD</i> -gent	pGEM TEasy	pGEM-fliD mit einer 1,3 kb großen Km ^r -Kassette inseriert in <i>EcoRI</i> -Schnittstelle bei Nukleotid 641 von 1.626 bp (FliF ORF); Amp ^r , Gm ^r	(Molofsky et al. 2005)

2.5 Oligonukleotide

Tab. 7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Schnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen.

Gruppe	Bezeichnung	T _m (°C)	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle
allgemeine Oligos				
	M13U	52,8	GTAAAACGACGGCCAGT	---
	M13R	54,5	GGAAACAGCTATGACCATG	---
<i>Δlpc2402</i> Mutante				
	lpc2402_fl 1U	58,5	CAGGATGCTCAATTAAACTTTCTACA	---
	lpc2402_fl 2R	59,7	CTCAAATGTCCAGTAGGATTACCAA	---
	lpc2402_fl Inv 3R	60,3	GCATCCCTCTCTAG <u>A</u> ATGACTC	<i>XbaI</i>
	lpc2402_fl Inv 4U	55,9	TTAAGTTGAGAATTCCTGATTTCATA	---
	lpc2402 XbaI 5U	64,8	CATTCTAGAGAGGGATGCATGCGTAG	<i>XbaI</i>
	lpc2402 SalI 6R	60,2	GAAGTCGACATTATTTTATTTTCGATTCAGA	<i>SalI</i>
	lpc2402_Mut_Test7U	57,3	CACATCTGCCCTGGTTCTTT	---
	lpc2402_Mut_Test8R	57,3	GCGACCAATCGTCTTGGTAT	---
FliD Mutante				
	FliD_Mut_Test 1U	60,4	AGCCAATTCTACACTATGAAATCAAcc	---
	FliD_Mut_Test 2R	58,4	gctaattggctttgccaatgtgt	---
	FliD_Mut_Test 3U	61,8	CGGACAAGATGCTACGTCTGC	---
	FliD_Mut_Test 4R	58,4	CACCAAAGCAATTCACCGTCTT	---
RT-PCR				
	RpoN_RNA_1F	60,6	GCGATATTGACCGAGTCATTGCT	---
	RpoN_RNA_2R	61,0	CAGACTATTGTTTGCGCGTTGGAT	---
	FleQ_RNA_F	61,0	GCGCGGATCGAAATATCGTTGATT	---
	FleQ_RNA_R	62,1	GTTACCTGGCCAGCTGTATTCG	---
	FliA_RNA_F	62,1	CAACAAACCCAGGAAGCTCTGG	---
	FliA_RNA_R	61,0	GCGATGCGTTGCTTGACTTAGAAT	---

FlaA_RNA_1F	61,0	GCTAACGATGGTATCTCCCTATCA	---
FlaA_RNA_2R	61,8	CTGCTTTGGCATAGGCAGACG	---
FleR_RNA_1F	61,0	GGTGCTTTTACCGGAGCATAACAAA	---
FleR_RNA_2R	61,0	TGGCCATGAATAGGACAACATTGC	---
lpc2402_RNA_1F	61,8	GCTACGGGCAACACTCGAATC	---
lpc2402_RNA_2R	61,0	CTCCTCCAAATTTGAACCCAGCAA	---
<i>fliA</i> Operon (mit Nr. für Abb. 29)			
FlhA_RT_1U (1)	60,3	GCTTTACCCGGAAGCAAATGG	---
FlhA_RT_2R (2)	60,3	GTCCGGGGTTTATTGCTAACCA	---
FlhA_FlhF_RT_1U (ig1)	61,8	GCTTTGAGCCAGGAATGGCAG	---
FlhA_FlhF_RT_2R (ig2)	62,4	CCTGGTAACGCTTAATCGCATCG	---
FlhF_RT_1U (3)	60,3	TGGCCCTGATGCCGTTATTTTG	---
FlhF_RT_2R (4)	60,5	CCTCCGGGACTCGTTGTC	---
FlhF_FleN_RT_1U (ig3)	60,3	CCGAATAGCAGCTCAGGAACAA	---
FlhF_FleN_RT_2R (ig4)	60,3	CAGAATGTGGAAATGCGTCCAC	---
FleN_RT 1U (5)	56,7	ATACCGCAGCAGGGATTTC	---
FleN_RT_2R (6)	61,0	GGCATGAGCAGCAGGTGAG	---
FleN_FliA_RT_1U (ig5)	61,8	GATACCGCAGCAGGGATTTC	---
FleN_FliA_RT_2R (ig6)	60,3	GACACACCCAACCTTTCAGCAA	---
FliA_RT_1U (7)	62,1	CAACAAACCCAGGAAGCTCTGG	---
FliA_RT_2R (8)	61,0	GCGATGCGTTGCTTGACTTAGAAT	---
FliA_MotA_RT_1U (ig7)	61,9	GCAATTCCAGAATGATTTCTGATGCTG	---
FliA_MotA_RT_2R (ig8)	61,3	GTTGCAACAAAAGCAACCGCAATAC	---
MotA_RT_1U (9)	61,3	GTTGACAGGTTTTCTCGCCATTATC	---
MotA_RT_2R (10)	62,4	ACCAGGCCTTCAACGACCATTTC	---
MotA_MotB_RT_1U (ig9)	61,8	TGCCCTGGGTAGTGAAACCTC	---
MotA_MotB_RT_2R	61,0	TGAAGGGTATTGGGGCGTTTCAAT	---

(ig10)

MotB_RT_1U (11)	60,3	ATCGATGGGTCGTATCGTATGC	---
MotB_RT_2R (12)	60,1	TCAGGATTGAGAATTCTGTCCACTTT	---

5'RACE

FlhF_RACE_1R	60,3	GGCAATTGCTCTGTGACTTGTG	---
FlhF_RACE_2R	59,4	GCCGTATTGGGACTAACACC	---
FlhF_RACE_3R	59,4	CAGCTGTGCTTCGAGCATTC	---
FleN_RACE_1R	61,0	CTCGGAAATCCCTGCTGCG	---
FleN_RACE_2R	59,8	CATGTTCCGCAGGACTCAACT	---
FleN_RACE_3R	59,4	CTGACGCCAGCGGGAC	---
FliA_RACE_1R	60,6	GGCTGCTAATGGAATCTTGCAAC	---
FliA_RACE_2R	60,3	GACACACCCAACTCTTCAGCAA	---
FliA_RACE_3R	59,8	GCTCCAATATGCGCACAGCAT	---

2.6 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem, Darmstadt; Becton Dickinson, Heidelberg; Biorad, München; Dianova, Hamburg; Fermentas, St. Leon-Rot; GE Healthcare/Amersham Biosciences, München; Gerbu, Gaiberg; Invitrogen, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; New England Biolabs, Frankfurt a.M.; Oxoid, Wesel; Promega, Mannheim; Qiagen, Hilden; Roche, Mannheim; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, München, Thermo Scientific, Bonn; VWR International, Nürnberg.

2.7 DNA- und Protein-Größenstandards

2.7.1 DNA-Größenstandards

Um die verschiedenen Größenstandards verwenden zu können, wurden zu einem Aliquot 400 µl TAE-Puffer und 100 µl 6x *Loading Dye* hinzu gegeben. Nach dem die Lösung gevortext wurde, konnte sie verwendet werden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

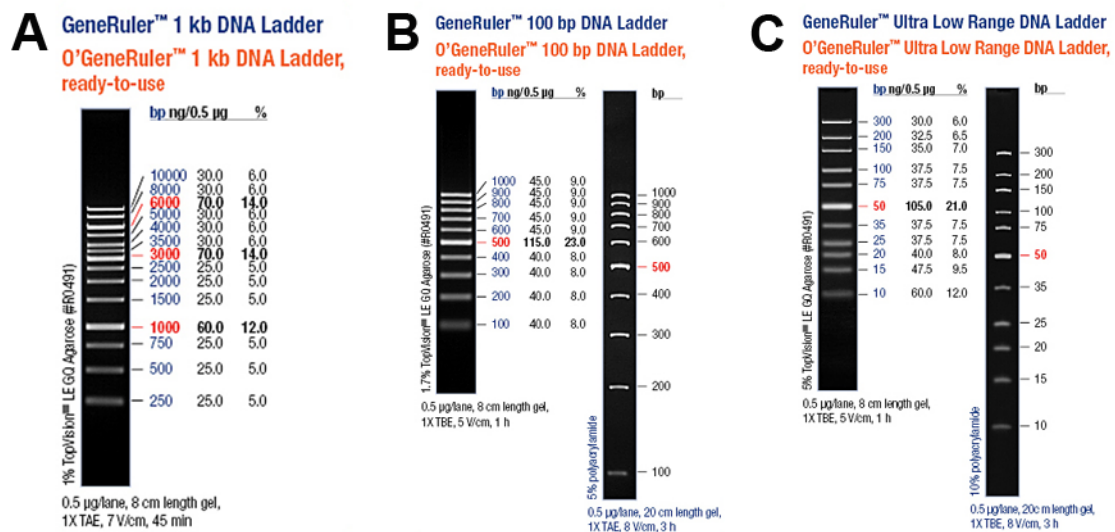


Abb. 16: Größenstandards zur Analyse von DNA-Fragmenten in Agarosegelen (Fermentas, St. Leon-Rot). (A) 1 kb DNA-Größenstandard, (B) 100 bp DNA-Größenstandard, (C) Ultra Low Range DNA-Größenmarker. Aufzutragen sind jeweils 8 µl.

2.7.2 Protein-Größenstandards

Die Protein-Größenstandards waren fertig zur Verwendung und wurden bei -20°C gelagert.

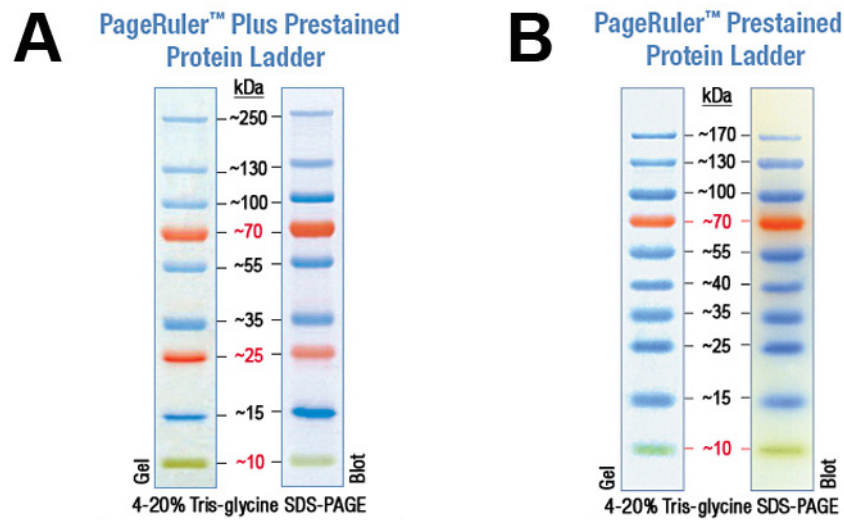


Abb. 17: Proteingrößenstandards zur Analyse von denaturierten Proteinen in Coomassiegelen oder Western Blots (Fermentas, St. Leon-Rot). (A) *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*. (B) *PageRuler Prestained Protein Ladder*. Aufzutragen sind jeweils 3 µl.

2.8 Antibiotika und Medienzusätze

Nachfolgende Antibiotika und Zusätze wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet und den verschiedenen Wachstumsmedien zugegeben.

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Antibiotikum (Stammlösung)	Lösungsmittel	für <i>Legionella</i> [µg / ml]		für <i>E. coli</i> [µg / ml]	
		Flüssigmedium	Nährböden	Flüssigmedium	Nährböden
Ampicillin (100 mg / ml)	H ₂ O _{dest}	---	---	100	100
Chloramphenicol (40 mg / ml)	Ethanol	8	20 (10 nach Elektroporation)	40	40
Kanamycin (40 mg / ml)	H ₂ O _{dest}	8	12,5	40	40
Gentamycin (10 mg / ml)	H ₂ O _{dest}	10	10	10	10

Weitere Zusätze in LB-Nährböden:

Tab. 9: In dieser Arbeit verwendete LB-Nährbodenzusätze. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Aufgrund des Lösemittels Dimethylformamid sollte X-Gal in Glas- oder Polypropylengefäßen und lichtgeschützt gelagert werden.

Bezeichnung	Lösungsmittel	Konz.
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	H ₂ O _{dest}	100 mM
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Dimethylformamid	2 % (w/v)

2.9 Antikörper

Folgende Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Die Lagerung der Seren erfolgte bei -80°C. Für die Inkubation auf Nitrozellulosemembranen wurden die Antikörper entsprechend in 1 % Milchpulver / TBS verdünnt. Die angesetzte Lösung konnte mehrfach verwendet und bei -20°C gelagert werden.

Tab. 10: In dieser Arbeit verwendete Antikörper. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Verbrauchsmengen wurden bei -20°C aufbewahrt.

Bezeichnung	Charakteristika	Bezugsquelle	Referenz
α-Momp (25 kD)	Monoklonaler Primärantikörper aus der Maus gegen <i>L. pneumophila</i> OmpM; Konz. 1:100	Monofluo α- <i>Legionella</i> staining reagent Kit; Biorad, München	(High et al. 1993; Helbig et al. 2007)
α-FleQ (53 kD)	Polyklonaler Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> FleQ; Konz. 1:500	Reuben Ramphal; Gainesville, Florida, USA	(Dasgupta et al. 2002; Jacobi et al. 2004; Albert-Weissenberger et al. 2010)
α-FliA (27 kD)	Polyklonaler Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen Peptide von FliA aus <i>L. pneumophila</i> ; Konz. 1:100	Rüdiger Schade; Inst. f. Pharmakologie u. Toxikologie der HU Berlin, Berlin, Deutschland	Klaus Heuner (Berlin) (Schulz et al. 2012)
α-FlaA (48 kD)	Polyklonaler Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen abgescherte Flagellen von <i>L. pneumophila</i> ; Konz. 1:1.000	Klaus Heuner; Berlin, Deutschland	(Jacobi et al. 2004)
αMaus-HRP	IgG (H+L) aus Ziege; spezifisch gegen Maus; konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP); Konz. 1:5.000	Dianova, Hamburg, Germany	---
αHase-HRP	IgG (H+L) aus Ziege; spezifisch gegen Kaninchen; konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP); Konz. 1:1.000	Dianova, Hamburg, Germany	---

2.10 Enzyme

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Enzyme den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Tab. 11: In dieser Arbeit verwendete Enzyme. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Bezeichnung	Charakteristika	Hersteller
RED <i>Taq</i> Ready Mix	PCR Mix	Sigma-Aldrich
Top- <i>Taq</i>	DNA-Polymerase	Qiagen
Go <i>Taq</i>	DNA-Polymerase	Promega
<i>Taq</i>	DNA-Polymerase	Invitek / Stratec
<i>XbaI</i>	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs/ Fermentas
<i>Sall</i>	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs/ Fermentas
<i>DpnI</i>	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs/ Fermentas
Antarktische Phosphatase	Phosphatase	New England Biolabs
Klenow- Enzym	Untereinheit der DNA-Polymerase	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	DNA-Ligase	New England Biolabs/ Fermentas

2.11 Verwendete Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits wurden entsprechend der Angaben des Herstellers benutzt.

Tab. 12: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Qiagen
DNeasy Blood & Tissue Kit	Promega
Plasmid Mini Kit	Qiagen
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitek / Stratec
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
PCR Purification Kit	Qiagen

High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
FastRNA Pro Blue Kit	MP Biomedicals
RNase-Free DNase Set	Qiagen
One Step RT PCR	Qiagen
5'/3'RACE Kit	Roche

2.12 Geräte

Gerät	Bezeichnung, Hersteller
aCOLyte Colony Counter	Don Whitley Scientific ltd.
Autoklav	Fedegari Autklavi
Brutschränke (30°C und 37°C)	Heraeus electricons, CO ₂ belüftet
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektroporator	BioRad
Entwicklermaschine	Agfa, Curex 60
Feinwaage	Chyo JL-180
Gel Dokumentationsanlage	BioRad Gel Doc 2000
Gefrierschrank (-20°C)	Privileg Öko
Gefrierschrank (-80°C)	Nunc
Graphitblotter	peqlab Biotechnologie GmbH
Grobwaage	Kern 470
Heizblock	Liebisch
Homogenisator	ULTRA-TURRAX T25, IKA-Labortechnik
Kühlschrank	Privileg Öko
Kühlzentrifuge	Heraeus, Multifuge 1 L-R
Magnetrührer	GLW M21
Nano Drop Spectrophotometer ND 1000	peqlab Biotechnologie GmbH

Netzgeräte	Biorad
PCR-Gerät	Biometra T3 Thermocycler
pH-Meter	WTW Multiline P4
Photometer	Amersham Bioscience Ultraspec 3100 pro
Pipetten	Eppendorf
Proteingelapparatur	BioRad Mini – Protean III Electrophoresis Cell
Schüttler	Certomat BS-1
Spiral Plater (WASP)	Don Whitley Scientific ltd.
Sterilwerkbank	Nunc Microflow
Thermoblock	Eppendorf Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Heraeus-Biofuge
Ultraschallgerät	Bandelin Sonolpus HD70
Vortexer	Vortex Genie 2

3. Methoden

3.1 Kultivierungstechniken

3.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde auf LB-Nährböden oder in LB-Flüssigmedium für 1 Tag bei 37°C kultiviert.

LB- Nährböden

12 g Agar

10 g Bacto Trypton

5 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

in 1.000 ml H₂O_{dest} lösen und autoklavieren

Gießen der Platten

LB- Flüssigmedium

10 g Bacto Trypton

5 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

in 1.000 ml H₂O_{dest} lösen und autoklavieren

Bei Bedarf wurden die Medien und Nährböden durch Antibiotika und weitere Zusätze supplementiert (Kapitel 2.8).

3.1.2 Kultivierung von verschiedenen *Legionella*-Stämmen

Die verschiedenen *Legionella* Stämme wurden auf BCYE-Nährböden für 2-3 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ oder in YEB-Flüssigmedium über Nacht unter Schütteln bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Aufgrund der komplexen Wachstumsanforderungen der Bakterien enthält das Medium Hefeextrakt als Nährstoff, ACES für die Pufferung und Aktivkohle zur Inaktivierung toxischer Sauerstoffradikale. L-Cystein dient als Energie- und Kohlenstoffquelle. Außerdem wird durch diese Aminosäure die Aufnahme von Eisen möglich, da es dreiwertige Eisenverbindungen in ihre transportierbare, zweiwertige Form überführt.

BCYE-Nährböden

10 g ACES

10 g Hefe-Extrakt

in 900 ml H₂O_{dest} lösen

pH-Wert mit 10 N KOH auf pH 6,9 einstellen

anschließend Zugabe von:

2 g Aktivkohle

15 g Agar

ad 1.000 ml H₂O_{dest}

Lösung autoklavieren

auf ca. 50°C abkühlen lassen

vor dem Gießen der Platten Zugabe von sterilfiltriertem

0,4 g L-Cystein in 10 ml H₂O_{dest}

0,25 g Fe^{III}(NO₃)₃ × 9 H₂O in 10 ml H₂O_{dest}

YEB-Flüssigmedium

10 g ACES

10 g Hefe-Extrakt

in 900 ml H₂O_{dest} lösen

pH-Wert mit 10 N KOH auf pH 6,9 einstellen

anschließend Zugabe von:

0,4 g L-Cystein in 10 ml H₂O_{dest}

0,25 g Fe₄(P₂O₇)₃ in 10 ml H₂O_{dest}

ad 1.000 ml H₂O_{dest}

Lösung in autoklavierte Flasche sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße)

Bei Bedarf wurden die Medien und Nährböden durch Antibiotika supplementiert (siehe Kapitel 2.8).

3.1.3 Kultivierung von *Acanthamoeba castellanii*

A. castellanii wurde in 25 cm² Zellkulturflaschen kultiviert (Nunc EasyFlasks™ #156367, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland). Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Amöben wurden jeden vierten Tag passagiert, wobei jeweils 1 ml der vom Boden abgeklopften und resuspendierten Zellen in eine Flasche mit 9 ml frischem PYG-Medium überführt wurde. Die Infektion von *A. castellanii* mit *Legionella* ist in Kapitel 3.4.1 beschrieben.

PYG-Wachstumsmedium

20 g Proteose Pepton

1 g Hefe-Extrakt

1 g $\text{Na}_3\text{-Citrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

10 ml $0,4 \text{ M MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

10 ml $0,25 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

10 ml $0,25 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$

8 ml $0,05 \text{ M CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

ad 940 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Lösung autoklavieren

anschließend sterilfiltriert hinzugegeben:

10 ml $0,005 \text{ M Fe(NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

50 ml 2 M Glukose

3.1.4 Konservierung von Bakterien

Die Bakterien von einer ganzen Agarplatte wurden mit einer Impföse abgenommen und in einem Cryo-Röhrchen mit 1 ml 20 % igem Glycerin resuspendiert. Dadurch konnten die Bakterien dauerhaft bei -80°C gelagert werden.

3.2 Nukleinsäure-Techniken

3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Bakterien wurden in Flüssigkultur bis zu einer bestimmten optischen Dichte bei 600 nm angezogen und geerntet. Gesamt-RNA wurde mittels des *FastRNA Pro Blue Kits* (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) bzw. dem *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche, Mannheim) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde die gereinigte RNA erneut mit 300 Einheiten pro ml DNase I (Roche, Mannheim) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die RNA mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt. Mit Hilfe des Standard-PCR-Protokolls (siehe Kapitel 3.2.17) und den spezifischen Primern für das *rpoN* Gen, RpoN_RNA_1F und RpoN_RNA_2R, wurde die Lösung auf eine mögliche Kontamination mit DNA hin untersucht. Im Falle des Nachweises von DNA wurde die Probe erneut DNase I verdaut und gereinigt. Die Qualität und Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem Gerät Nanodrop 1.000 bestimmt.

3.2.2 Isolation von chromosomaler DNA

Für die Isolation chromosomaler DNA wurden Bakterien auf Nährböden kultiviert. Diese wurden mit 3 ml Lösung I abgeschwemmt und die Suspension für 6 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Lösung II resuspendiert und anschließend mit 60 µl 250 mM EDTA pH 8 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C unter leichtem Schütteln wurde 40 µl 250 mM EDTA pH 8 und 48 µl 10 % SDS zugegeben und der Ansatz wurde für weitere 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Proteine wurden durch Zugabe von 625 µl TES-Puffer pH 8 und 6 µl Proteinase K (10 mg / ml) für 1 h bei 37°C verdaut. Zum Entfernen der Proteinreste wurden 250 µl 5 M NaClO₄ und 250 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, die Lösung für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur in Schräglage geschüttelt. Durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min wurden drei Phasen erkennbar. Die untere Phase und die weiße Interphase enthielten die Proteine und wurden verworfen. Die obere, DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Waschschritt mit Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) wurde die DNA durch Zugabe von 3 Volumenteilen eiskaltem absolutem Ethanol für 1 h bei -20°C gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min pelletiert und in 100 µl H₂O_{dest} aufgenommen. Die Konzentration

der DNA wurde mit dem Gerät Nanodrop 1.000 bestimmt. Die Lagerung der chromosomalen DNA erfolgte bei 4° C.

Lösung I

0,15 M NaCl

0,1 M EDTA (pH 8)

Lösung II

1 M Saccharose

10 mM Tris / HCl (pH 8)

TES-Puffer

30 mM Tris / HCl (pH 7,5)

5 mM EDTA (pH 7,5)

5 mM NaCl

Alternativ zu dieser Methode wurde die Isolation mit Hilfe des *Wizard Genomic DNA Purification Kits* (Promega, Mannheim) oder des *DNeasy Blood & Tissue Kits* (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.3 Isolation von Plasmid-DNA

Bakterielle Plasmide wurden aus 2-3 ml Bakterienkultur mit Hilfe des *Plasmid Mini Kit* (Qiagen, Hilden) bzw. *Invisorb Spin Plasmid Mini Two* (Invitek / Stratec, Berlin) entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

3.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Mittels Phenol-Chloroform-Extraktion konnten Proteine aus einem DNA-Protein-Gemisch entfernt werden. Dazu wurde das Gemisch mit 1 Volumen Phenol und 1 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gevortext. Nach einer Zentrifugation von 13.000 rpm für 5 min waren drei Phasen zu erkennen. Die untere Phase und die weiße Interphase enthielten die Proteine und wurden verworfen. Nur die obere DNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat und 1 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol und anschließendem Vortexen und Zentrifugieren wurde das Gemisch erneut gewaschen. Wieder wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA konnte nun aus der Lösung gefällt werden (siehe Kapitel 3.2.5).

3.2.5 DNA Fällung

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat-Lösung und 3 Volumenteilen eiskaltem absoluten Ethanol versetzt und für 20 min bei -80°C oder für 1 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das getrocknete Pellet in H₂O_{dest} gelöst.

3.2.6 Restriktionsverdau

Für den Verdau von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen New England Biolabs und Fermentas (siehe Kapitel 2.10) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Restriktionsansatz Doppelverdau

x µl DNA (ca. 1 µg)

7 µl 10x NEB-Puffer

0,7 µl 100x BSA (wenn nötig)

1 µl Enzym A

1 µl Enzym B

ad 50 µl H₂O_{dest}

Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei 37°C. Anschließend wurden die Enzyme für 20 min bei 65°C inaktiviert. Danach wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und eluiert (siehe Kapitel 3.2.23).

3.2.7 *DpnI* Verdau

DNA, welche durch das Bakterium *E. coli* DH5 α amplifiziert wurde, liegt methyliert vor, während durch PCR amplifizierte DNA nicht methyliert ist. Die Restriktionsendonuklease *DpnI* bindet spezifisch an methylierte DNA und kann somit nach einer PCR selektiv die eingesetzte *E. coli* DNA verdauen, während das künstlich entstandene PCR-Produkt erhalten bleibt.

Restriktionsansatz *DpnI* Verdau

42 μ l PCR Produkt

5 μ l NEB-Puffer 4

3 μ l *DpnI*

Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37°C. Das Enzym wurde durch Inkubation bei 65°C für 20 min oder Einfrieren inaktiviert. Bei anschließender Gelelution musste das Enzym nicht inaktiviert werden.

3.2.8 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

Eine Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA durch Antarktische Phosphatase (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) verhindert die Religation des Vektors ohne ein Insert.

Dephosphorylierungsansatz

x µl DNA (1-5 µg)

2 µl 10x Antarktische Phosphatase Puffer

1 µl Antarktische Phosphatase (5U)

ad 20 µl H₂O_{dest}

Die Dephosphorylierung wurde für 1 h bei 37°C durchgeführt. Das Enzym wurde anschließend für 5 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

3.2.9 Klenow-Reaktion

Die große Untereinheit der DNA Polymerase I wird als Klenow-Fragment bezeichnet. Es hat die Eigenschaften 5' Überhänge auffüllen und besitzt 3'-5' Exonukleaseaktivität. Die 5'-3' Exonukleaseaktivität ist in der kleinen Untereinheit der DNA-Polymerase I lokalisiert und fehlt daher im Klenow-Enzym. Mit Hilfe dieses Enzyms können stumpfe DNA-Enden erzeugt werden. Dieses Verfahren wurde im Anschluß an die Inverse PCR angewendet (siehe Kapitel 3.2.18).

Klenow-Reaktion

2 µl Klenow-Enzym

5 µl 10x NEB-Puffer 2

1 µl Desoxyribonukleotide (20 mM)

20 µl PCR-Produkt

ad 50 µl H₂O_{dest}

Die Reaktion wurde für 30 min bei RT durchgeführt. Die Inaktivierung des Enzyms wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.4). Dazu wurde der Ansatz mit 1 Volumenteil Phenol versetzt und gevortext. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 1 Volumenteil Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) und erneutes Vortexen. Durch Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm erfolgte eine Phasentrennung. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde zu dem Überstand (wässrige, DNA-haltige Phase) 1 Volumenteil Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) und 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat gegeben und erneut für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die DNA gefällt und in 71 µl H₂O_{dest} aufgenommen (siehe Kapitel 3.2.5). Die so behandelte DNA konnte nun religiert werden.

3.2.10 Religation

Die Religation wurde mit dem Produkt der Inversen PCR durchgeführt, welches nach der Klenow-Reaktion stumpfe Enden aufwies.

Religation

71 µl PCR-Produkt

1 µl T4 DNA-Ligase

8 µl 10x T4 DNA-Ligase-Puffer

ad 80 µl H₂O_{dest}

Die Reaktion wurde über Nacht bei 4°C bzw. 3 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte entweder bei 65°C für 15 min oder durch Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Kapitel 3.2.4). Anschließend wurde die DNA gefällt (siehe Kapitel 3.2.5) und konnte weiter verwendet werden.

3.2.11 Ligation von DNA mit dem *pGEM TEasy Ligation Kit*

Der Vektor pGEM TEasy aus dem Kit (Promega, Mannheim) liegt bereits linearisiert vor und besitzt an seinen Enden 5' T-Überhänge (Vektorkarte siehe Kapitel 2.3). PCR-Produkte, die mit einer *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden, besitzen 3' A-Überhänge. Daher ist die direkte Ligation des gefällten PCR-Produktes in den Vektor möglich. Das Mischungsverhältnis von PCR-Produkt zu Vektor sollte dabei 3 zu 1 betragen. Der Versuch wurde wie folgt durchgeführt:

pGEM TEasy Ligationsansatz

x µl PCR-Produkt (300 ng)

y µl pGEM TEasy Vektor (100 ng)

2 µl TEasy Ligase

10 µl 2x TEasy Puffer

ad 20 µl H₂O_{dest}

Die Ligation erfolgte bei 4°C über Nacht bzw. 1 h bei Raumtemperatur. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ansatz für 15 min in den 65°C Heizblock gestellt. Anschließend wurde die DNA gefällt (siehe Kapitel 3.2.5) und in 10 µl H₂O_{dest} aufgenommen. Die Lösung wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet. Der Vektor pGEM TEasy trägt eine Ampicillinresistenz und konnte für die Transformation von natürlicherweise ampicillinresistenten Legionellen nicht benutzt werden. Stattdessen wurde für die Mutantenherstellung die Methode der natürlichen Transformation verwendet (Kapitel 3.2.16)

3.2.12 Ligation von DNA mit T4 Ligase

Um zwei DNA-Stücke mit gleichen Enden zu verbinden wurde die T4 Ligase des T4 Phagen benutzt. Das Mischungsverhältnis von PCR-Produkt zu Vektor sollte dabei 3 zu 1 betragen. Der Ansatz wurde nach folgendem Schema erstellt.

T4 Ligationsansatz

x µl PCR-Produkt (300 ng)

y µl pBCKS Vektor (100 ng)

2 µl T4 Ligase

2 µl 10x Teasy Puffer

ad 20 µl H₂O_{dest}

Die Ligation erfolgte bei 4°C über Nacht oder 3 h bei Raumtemperatur. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ansatz für 20 min in den 65°C Heizblock gestellt oder die Phenol-Chloroform-Extraktion verwendet (siehe Kapitel 3.2.4). Anschließend erfolgten eine DNA-Fällung und die Aufnahme der DNA in 10 µl H₂O_{dest}.

3.2.13 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde eine Vorkultur von 3 ml LB-Medium mit etwas Bakterienmaterial beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml exponentieller ÜN-Kultur (OD₆₀₀~1.0) angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 (ca. 4 h) inkubiert. Die Bakterien wurden für 10 min bei 4.500 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Im Folgenden wurde das Pellet dreimal mit kaltem 10 %igem Glycerin gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem 10 %igen Glycerin aufgenommen und jeweils 100 µl in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Bakterien wurden bis zur Elektroporation bei -80°C gelagert.

3.2.14 Herstellung elektrokompetenter *L. pneumophila* Zellen

Zur Herstellung kompetenter Legionellen wurde eine Vorkultur von 4 ml YEB-Medium mit Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100 µl der *Legionella* Vorkultur mit einer OD₆₀₀ von 1,5-2 auf BCYE-Nährboden ausplattiert und für 24 h bei 37°C kultiviert. Nach 24 h war ein Bakterienrasen erkennbar. Die Legionellen wurden mit eiskaltem 10 %igem Glycerin abgeschwemmt, resuspendiert und wie bereits für

E. coli beschrieben dreimal mit kaltem 10 %igem Glycerin gewaschen und anschließend aliquotiert.

3.2.15 Transformation durch Elektroporation

Ein Aliquot kompetenter Bakterien (siehe Kapitel 3.2.13 und 3.2.14) wurde auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 5 µl Plasmid-DNA (siehe Kapitel 3.2.3, 3.2.11 und 3.2.12) in eine auf Eis stehende, vorgekühlte Elektroporationsküvette (Biorad, München) überführt. Anschließend erfolgte die Elektroporation (Gene Pulser, Biorad) bei 100 Ω, 25 µF. Für die Transformation von *E. coli* wurden 1,7 kV angelegt, für *Legionella* betrug die Spannung 2,3 kV. Der Zeitwert sollte 2- 2,5 msec betragen. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien sofort in 1 ml vorgewärmtes Medium ohne Antibiotikum übertragen und für 24 h in YEB-Medium (*Legionella*) bzw. für 1 h in LB-Medium (*E. coli*) bei 37° C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf einem entsprechenden Nährboden mit Antibiotika ausplattiert. Die restliche Lösung wurde 10 min für 4.000 rpm zentrifugiert, 800 µl des Überstandes verworfen und das Pellet mit dem verbleibenden Überstand resuspendiert. Diese aufkonzentrierte Bakteriensuspension wurde auf mehreren Antibiotika-haltigen Nährböden verteilt und bei 37°C inkubiert.

Die Nährböden mit Antibiotika wurden verwendet um Bakterien zu selektieren, die das transformierte Plasmid tragen. Die Nährböden für *E. coli* Transformanden enthielten zusätzlich X-Gal und IPTG (siehe Kapitel 3.1.1). Dadurch war eine Blau-Weiß-Selektion möglich, wobei die resultierenden weißen Klone den Vektor mit dem Insert enthielten. Die erfolgreiche Transformation der Bakterien wurde in einer „Aufkoch-PCR“ (siehe Kapitel 3.2.19) mit spezifischen Primern überprüft. Häufig wurden dabei die M13-Primer verwendet, die die *multiple cloning site* des Vektors umschließen und eine mögliche Insertion an dieser Stelle aufzeigen können.

3.2.16 Natürliche Transformation von *L. pneumophila*

Die verschiedenen *Legionella* Stämme sind in der Lage DNA aus der Umgebung aufzunehmen (Sexton and Vogel 2004). Über homologe Rekombination kann die DNA dann ins Chromosom integriert werden. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu genutzt Gene oder Genabschnitte durch eine Resistenzkassette auszutauschen und somit diesen DNA-

Abschnitt zu deletieren (siehe Kapitel 3.2.25). Die resultierenden Mutanten wurden anschließend phänotypisch untersucht.

Zunächst wurde das zu rekombinierende, klonierte Konstrukt mittels 4-6 fachen 100 µl PCR-Ansatzes amplifiziert. Das Produkt wurde mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Mannheim) aufgereinigt und bis zur späteren Verwendung bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Bakterien vorbereitet. Dazu wurden 3 ml YEB-Medium als Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 2 x 3 ml frisches YEB-Medium in einem Plastik-Röhrchen mit 200 µl der Vorkultur angeimpft und die beiden Röhrchen bei 37°C geschüttelt. Es wurden keine Röhrchen aus Glas verwendet, da DNA stark an Glas bindet.

Am Abend wurde in einem Röhrchen die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Der Wert sollte ungefähr bei 1,0 liegen und somit der exponentiellen Phase einer *Legionella* Kultur entsprechen. Zu dem anderen Röhrchen wurde nun der gesamte, zuvor gereingte PCR-Ansatz zugegeben und mit den Bakterien vermischt. Anschließend wurde das Röhrchen für 3 Tage bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Danach wurde die gesamte Suspension auf Antibiotika-haltigen Nährböden bei 37°C angezüchtet. Nach 3-5 Tagen konnten Transformanten gepickt und mittels „Aufkoch-PCR“ überprüft werden (siehe Kapitel 3.2.19).

3.2.17 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde zur Amplifikation von chromosomaler DNA, Plasmid-DNA oder linearisierter doppelsträngiger DNA eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *Taq*-Polymerasen verwendet, wodurch sich die Protokolle zum Teil unterschieden. Die Reaktion der PCR blieb aber in allen Ansätzen die gleiche. Bei einer PCR-Reaktion wird zunächst der Doppelstrang der Ursprungs-DNA durch Hitzedenaturierung (~95°C) in Einzelstränge getrennt. Danach erfolgt die sequenzspezifische Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge, was auch als *Annealing* bezeichnet wird. Die Schmelztemperatur der Primer richtet sich nach ihrer Länge und dem G/C-Gehalt der Sequenz. Die Schmelztemperatur kann folgendermaßen berechnet werden:

$$T_m = [(G + C) \times 4] + [(A + T) \times 2]$$

T_m = Schmelztemperatur (in °C), A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin

Im Folgenden verlängert die hitzestabile DNA-Polymerase die Primer von 5' nach 3'Richtung (Elongation). Eine *Taq*-Polymerase benötigt je nach Hersteller und Produkt ungefähr 1 min zur Amplifikation von 1 kb DNA.

PCR-Reaktion

1. Initiale Denaturierung:	94°C	1 min
2. Denaturierung:	94°C	1 min
3. Primer-Anlagerung:	50-60°C	1 min
4. Elongation:	72°C	1-6 min
5. abschließende Elongation:	72°C	5 min
6. Kühlung:	16°C	Pause

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 29-34 Zyklen wiederholt, was zur exponentiellen Amplifikation der DNA führt. Nachstehend werden DNA-Polymerasen verschiedener Hersteller und deren Protokolle aufgelistet.

PCR mit Top*Taq*-Polymerase (Qiagen)

x µl	DNA (ca. 0,5 µg)
5 µl	10x PCR-Puffer
10 µl	Q-Puffer
0,25 µl	Primer U (100 pmol/µl)
0,25 µl	Primer R (100 pmol/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)
0,5 µl	Top <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl H ₂ O _{dest}	

PCR mit GoTaq-Polymerase (Promega)

x µl	DNA (ca. 0,5 µg)
10 µl	10x GoTaq-Flexi-Puffer
5 µl	MgCl ₂
0,5 µl	Primer U (100 pmol/µl)
0,5 µl	Primer R (100 pmol/µl)
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl H ₂ O _{dest}	

PCR mit Taq-Polymerase (Invitex / Stratec)

x µl	DNA (ca. 0,5 µg)
5 µl	10x Puffer
3 µl	MgCl ₂
0,25 µl	Primer U (100 pmol/µl)
0,25 µl	Primer R (100 pmol/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)
0,3 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl H ₂ O _{dest}	

PCR mit Red*Taq*-PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich)

x µl	DNA (ca. 0,5 µg)
25 µl	PCR Reaction Mix
0,5 µl	Primer U (100 pmol/µl)
0,5 µl	Primer R (100 pmol/µl)
ad 50 µl H ₂ O _{dest}	

3.2.18 Inverse PCR

Mit Hilfe der Inversen PCR konnten die flankierenden Bereiche eines bestimmten DNA-Abschnittes amplifiziert werden. Diese wurden zunächst zusammen mit dem zentralen Element in einen Vektor kloniert. Anschließend wurde mit Primern, die von dem zentralen DNA-Abschnitt weg gerichtet sind, die flankierenden Bereiche zusammen mit dem Vektor amplifiziert. Dieses Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Herstellung verschiedener Mutanten benutzt (siehe Kapitel 3.2.25).

Inverse PCR-Ansatz (Top*Taq* von Qiagen)

x µl	Plasmid-DNA (ca. 0,5 µg)
10 µl	10x PCR-Puffer
20 µl	Q-Puffer
0,5 µl	Primer U (100 pmol/µl)
0,5 µl	Primer R (100 pmol/µl)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Top <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
ad 100 µl H ₂ O _{dest}	

PCR-Reaktion

1. Initiale Denaturierung:	94°C	1 min
2. Denaturierung:	94°C	1 min
3. Primer-Anlagerung:	55°C	1 min
4. Elongation:	72°C	5-6 min
5. abschließende Elongation:	72°C	8 min
6. Kühlung:	16°C	Pause

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 29-34 Zyklen wiederholt.

3.2.19 PCR mit ganzen Bakterien („Aufkoch-PCR“)

Mit Hilfe der „Aufkoch-PCR“ wurden die Bakterien im PCR-Block aufgeschlossen und anschließend eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Dazu wurden 30 µl H₂O_{dest} in PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt und etwas Bakterienmaterial (separate Einzelkolonien) mit einem sterilen Zahnstocher von der Nährbodenplatte überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe aller weiteren für die PCR benötigten Komponenten (siehe Kapitel 3.2.17). Der initiale Denaturierungsschritt wurde auf 7 min erhöht, wodurch die Bakterien aufgeschlossen wurden und die DNA für die PCR zugänglich gemacht wurde.

3.2.20 Sequenzierungs-PCR

Für die Untersuchung der genauen Sequenz eines DNA-Stückes wurde die Methode der Sanger-Sequenzierung durchgeführt (Sanger and Coulson 1975; Sanger et al. 1977). Dabei wurden während einer PCR fluoreszierende Nukleotide in die DNA eingebaut. Durch Detektion des Farbstoffes und der Länge des PCR-Produkts wurde dann auf die eingebaute Nukleinsäure rück geschlossen. Für die Sequenzierung von DNA wurde eine PCR mit dem *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Für die PCR-Reaktion wurden die folgenden DNA-Mengen eingesetzt:

PCR-Produkte (100-200 bp)	1-3 ng
PCR-Produkte (200-500 bp)	3-10 ng
PCR-Produkte (500-200 bp)	10-20 ng
Plasmide	150-300 ng

Sequenzierungs-Reaktionsansatz

x µl DNA (in H₂O_{dest})
1,5 µl 5x Puffer
0,5 µl Primer (10 pmol/µl)
1 µl BigDye v3.1 Mix
ad 10 µl H₂O_{dest} (HPLC-Qualität)

PCR-Reaktion

1. Initiale Denaturierung:	96°C	2 min
2. Denaturierung:	94°C	10 sec
3. Primer-Anlagerung:	45-60°C	10 sec
4. Elongation:	60°C	4 min
5. Kühlung:	4°C	Pause

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 25 Zyklen wiederholt. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden in der Sequenzierungsabteilung des Robert Koch-Institutes durch Gelfiltration aufgereinigt und anschließend analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms *BioEdit*.

3.2.21 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) diente dem Nachweis von RNA in einer Probe. Dazu wurde zunächst Gesamt-RNA isoliert, DNase I verdaut und aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.1). Mit dem Enzym Reverse Transkriptase aus dem *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen, Hilden) wurde RNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Mit dieser konnte anschließend mit spezifischen Primern eine PCR durchgeführt werden. Durch eine unterschiedliche Anzahl von PCR-Zyklen konnten semiquantitative Aussagen über die vorliegende mRNA-Menge des untersuchten Gens gemacht werden. Die Reverse Transkriptase Reaktion wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengestellt.

RT-PCR-Reaktionsansatz

x µl Gesamt-RNA (10 ng in H₂O_{dest})

5 µl 5x OneStep RT-PCR Puffer (enthält 12,5 mM MgCl₂)

1 µl dNTPs (400µM)

0,5 µl Primer U (0,5 µM)

0,5 µl Primer R (0,5 µM)

1 µl OneStep RT-PCR Enzym-Mix

ad 25 µl H₂O_{dest}

Es wurden jeweils 10 ng Gesamt-RNA eingesetzt und für 30 min bei 50°C inkubiert. Dieser Schritt diente der cDNA-Synthese. Anschließend wurde die PCR-Reaktion im selben Reaktionsgefäß durchgeführt. Dazu wurde zunächst bei 95°C für 15 min die Reverse Transkriptase hitze-inaktiviert und die enthaltene HotStar*Taq* DNA-Polymerase aktiviert. Danach konnte das Standard-PCR- Protokoll durchgeführt werden.

PCR-Reaktion

1. cDNA-Synthese:	50°C	30 min
2. Initiale Aktivierung:	95°C	15 min
3. Denaturierung:	94°C	1 min
4. Primer-Anlagerung:	55°C	1 min
5. Elongation:	72°C	1 min, 30 sec
6. Finale Elongation:	72°C	10 min
7. Kühlung:	8°C	Pause

Die Schritte 3 bis 5 wurden in separaten PCR-Ansätzen in 24, 27 und 30 Zyklen wiederholt, wodurch eine semiquantitative Auswertung ermöglicht wurde (siehe Anhang). Mit einem 2 %igen Agarose-Gel wurden die Reaktionen visualisiert und analysiert.

3.2.22 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der horizontalen Gelelektrophorese wurden im Rahmen dieser Arbeit DNA aus verschiedenen PCR- und RT-PCR-Reaktionen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und visualisiert. Dazu wurden 500 ml TAE-Puffer mit 0,9 % Agarose aufgekocht und unter Rühren auf ca. 50°C abgekühlt. Das flüssige Gel wurde in die Gießvorrichtung der Flachgelapparatur (Biorad, München) mit eingesetzten Kämmen gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die Laufkammer mit 1x TAE-Puffer eingesetzt und die Kämmen entfernt. Die DNA-Proben wurden in DNA-Probenpuffer resuspendiert und in die Taschen des Gels aufgetragen. Zur Bestimmung der DNA-Größe wurden jeweils 8 µl DNA Größenstandard in die erste und letzte Tasche aufgetragen (siehe Kapitel 2.7.1). Die Elektrophoresekammer wurde so an eine Stromquelle angeschlossen, dass die negativ geladene DNA von der Kathode zur positiv geladenen Anode entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V bis zur ausreichenden Auftrennung der DNA (ca. 45 min). Zur Visualisierung wurde das Agarose-Gel für ca. 15 min in ein Ethidiumbromid-Bad (100 µg/ml H₂O_{dest}) gelegt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und leuchtet unter UV-Licht. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde die

aufgetrennte DNA sichtbar gemacht und anschließend in einer Geldokumentationsapparatur unter UV-Licht fotografiert.

DNA-Probenpuffer (10x)

0,127 g Bromphenolblau

0,125 g Xylocymol (Xylencyanol)

0,78 g Ficol 400

ad 50 ml H₂O_{dest}

50x TAE-Puffer

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

ad 1.000 ml H₂O_{dest}

3.2.23 Gelelution von DNA-Fragmenten durch Kälte-Phenol-Extraktion

DNA Banden der entsprechenden Größe wurden unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, in Reaktionsgefäßen überführt und mit einem Glasstab zerstampft. Besonders DNA von großen Fragmenten konnte mit dieser Methode gut gereinigt werden. Nach Zugabe von 400 µl Phenol wurde das Gemisch gevortext und für 1 h bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen und erneutem Vortexen wurde für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen 3M Natrium-Acetat und ½ Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Das Gemisch wurde für 2 min gevortext und anschließend für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß die DNA gefällt (siehe Kapitel 3.2.5). Alternativ wurde das Gelstück mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* behandelt.

3.2.24 Bestimmung des Transkriptionsstarts eines Gens (5'-RACE Methode)

Die 5'-RACE-Methode (*rapid amplification of cDNA ends*) (5'/3' RACE Kit, Roche, Mannheim) wurde verwendet, um das 5' Ende einer mRNA zu amplifizieren und damit den Transkriptionsstart des Gens zu bestimmen. Am Beispiel des *fliA* Gens wird im Folgenden die Durchführung beschrieben.

Zunächst wurde aus spät exponentiell gewachsenen Flüssigkulturen von *Legionella pneumophila* Corby Wildtyp und verschiedenen Mutanten die Gesamt-RNA isoliert (siehe Kapitel 3.2.1). Das RACE-Kit wurde anhand der Herstellerangaben verwendet. Zur Kontrolle wurde allen Reaktionsansätzen neben der isolierten RNA die im Kit enthaltene RNA zugesetzt und nach jedem Reaktionsschritt 1 µl für eine spätere Kontroll-PCR entnommen. Die Synthese der cDNA erfolgte mit 3 µg RNA und dem spezifischen Primer FliA_RACE_1R. Die RNase H Aktivität der Reversen Transkriptase führte zum Verdau der eingesetzten RNA. Die cDNA wurde mit dem *High Pure PCR Purification Kit* (Roche) anhand des im 5'/3' RACE Kit beiliegenden Protokolls aufgereinigt. Mit einer Terminalen Transferase wurde ein Poly-A-Schwanz an das 3' Ende der cDNA angehängt, um eine Amplifikation des 5' Endes durchführen zu können. Die PCR erfolgte mit dem im Kit enthaltenen Oligo(dT)-Anker Primer und dem spezifischen Primer FliA_RACE_2R nach dem angegebenen PCR-Protokoll bei einer *Annealing*-Temperatur von 55°C. Da die Transkriptionsrate von *fliA* schwach war, wurde eine zweite PCR durchgeführt, wobei statt dem Primer FliA_RACE_2R der Primer FliA_RACE_3R verwendet wurde. Eine PCR mit im Kit enthaltenen Primern und je 1 µl cDNA, aufgereinigte cDNA und Poly(A) cDNA ermöglichte die Überprüfung der Reaktionsschritte der in den Ansätzen enthaltenen Kontroll-RNA. Schließlich wurden die Produkte der Kontroll-PCRs und die Produkte der *fliA*-Amplifikations-PCRs in einem 2 %-igen Agarose-Gel mit dem 100 bp DNA Größenmarker (Fermentas, St. Leon-Rot) analysiert. Das Produkt aus der PCR mit dem FliA_RACE_3R Primer wurde mit dem *High Pure PCR Purification Kit* (Roche) dem Herstellerangaben entsprechend aufgereinigt und mit dem Primer FliA_RACE_3R direkt sequenziert.

Die Methode wurde ebenfalls zur Bestimmung der Startpunkte der Gene *flhF* und *fleN* verwendet. Die jeweiligen genspezifischen Primer trugen eine ähnliche Nomenklatur (z.B. *Gengename_RACE_1R*).

3.2.25 Herstellung von Mutanten

Für die Charakterisierung bestimmter Gene ist es eine Standard-Methode der Molekularbiologie diese Gene zu deletieren, den daraus resultierenden Phänotyp zu bestimmen und auf die Funktion des Gens rückzuschließen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Deletionen oder Insertionen von Genen hergestellt. Für die Erstellung einer Deletionsmutante wurden viele der bisher beschriebenen Methoden eingesetzt. Folgendes Protokoll wurde verwendet.

Im ersten Schritt wurde das zu deletierende Gen mit flankierenden Bereichen von je 1.000 bp *upstream* und *downstream* amplifiziert. Um die DNA aufzukonzentrieren und Salze zu entfernen wurde die DNA gefällt (Kapitel 3.2.5) und in H₂O_{dest} aufgenommen. Es folgte die Ligation in den Vektor pGEM TEasy (Kapitel 3.2.11). Das Plasmid wurde durch Elektroporation in *E. coli* DH5 α eingebracht (Kapitel 3.2.15) und in einer Plasmidisolation reisoliert (Kapitel 3.2.3). In der folgenden Inversen PCR wurden spezifische Primer mit einer *Xba*I-Schnittstelle verwendet (Kapitel 3.2.18). Dabei wurden 2 x 100 μ l PCR Ansätze verwendet. Zur Aufreinigung wurde das *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Produkte der beiden Ansätze wurden auf eine Säule aufgetragen und in 42 μ l H₂O_{dest} eluiert. Um das Ursprungs-Plasmid aus dem Ansatz zu entfernen, wurde ein *Dpn*I Verdau durchgeführt (Kapitel 3.2.7). *Dpn*I verdaut nur methylierte DNA und damit das in *E. coli* DH5 α amplifizierte Plasmid, nicht aber die PCR-Produkte. Die Ansätze wurden in einem 0,9 %igem Agarose-Gel aufgetrennt. Die Bande mit dem PCR-Produkt wurde aus dem Gel eluiert (Kapitel 3.2.23) und einer Klenow-Reaktion unterzogen um stumpfe Enden herzustellen (Kapitel 3.2.9). Diese wurde mittels Religation wieder verbunden (Kapitel 3.2.10) und das Plasmid wurde erneut in *E. coli* DH5 α eingebracht und isoliert (Kapitel 3.2.15 und 3.2.3).

Zum Einbringen der Kanamycin-Kassette in das Plasmid wurde ein *Xba*I-Restriktionsverdau mit der Kassette und dem Plasmid durchgeführt (Kapitel 3.2.6). Die Enden des linearisierten Plasmids wurden dephosphoryliert (Kapitel 3.2.8). Danach erfolgte die Ligation (Kapitel 3.2.10) und erneute Amplifikation des Plasmids in *E. coli* DH5 α (Kapitel 3.2.15 und 3.2.3). Schließlich wurde das Konstrukt aus Kanamycin-Kassette mit den 1.000 bp flankierenden chromosomalen Regionen des Zielgens in einem 4-6x 100 μ l PCR Ansatz mit spezifischen Primern amplifiziert (Kapitel 3.2.17). Das PCR-Produkt wurde mit dem *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Mannheim) aufgereinigt und über natürliche Transformation in *Legionella* eingebracht (Kapitel 3.2.16).

Die homologe Rekombination und damit der Austausch des Gens durch die Kanamycin-Kassette wurde durch Aufkoch-PCR (Kapitel 3.2.19) mit spezifischen Primerpaaren, die unter anderem außerhalb der klonierten Bereiche liegen, überprüft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Deletionsmutanten des Gens *lpc2402* hergestellt. Die dafür nötigen Konstrukte wurden dazu nach oben stehendem Protokoll erstellt. Im Weiteren wurden Insertionsmutanten des *fliD* Gens hergestellt. Die Konstrukte für dieses Gen wurden freundlicherweise von Michele S. Swanson zur Verfügung gestellt.

3.3 Proteinchemische Techniken

3.3.1 Präadsorption von Antikörpern

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermindern, wurde die Präadsorption von polyklonalen FlaA-Antikörpern gegen das Lysat der Δ *flaA* Mutante von *Legionella pneumophila* und gegen das Lysat des nicht-flagellierten *E. coli* DH5 α durchgeführt. Die gewachsenen Bakterien von jeweils 3 Nährbodenplatten wurden mit 3 ml TBS abgeschwemmt. Die Zellwand wurde durch die Zugabe von 10 μ l Lysozym (50 mg/ml) und die Inkubation für 10 min bei 37°C zerstört. Die anschließende Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, 3x 45 sec, 65 % Intensität, 4 Zyklen) führte zur Lyse der Bakterien. Die Lysate beider Bakterienarten wurden anschließend vereinigt. Dazu wurde das Gesamt-Lysat in 10 ml TBS aufgenommen. Im Weiteren wurde eine Nitrozellulose-Membran mit dem Lysat unter leichtem Schütteln 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran war nun mit Proteinen aus der *Legionella* Δ *flaA* Mutante und *E. coli* DH5 α abgesättigt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBS gewaschen. Daraufhin konnte der Antikörper in einer 1:10 Verdünnung in TBS für 1 h 30 min auf der Membran inkubiert werden. Alle unspezifischen Antikörper (nicht-FlaA Antikörper) konnten binden. In der verbleibenden Lösung sollten nun nur noch FlaA-spezifische Antikörper vorliegen. Die Antikörperlösung wurde anschließend aliquotiert und für den Western Blot verwendet.

10 x TBS-Puffer

76,5 g NaCl

54 g Tris/HCl

ad 900 ml H₂O_{dest}

pH-Wert auf pH 7,6 einstellen

Lösung autoklavieren

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden denaturierte Proteine nach ihrer Masse aufgetrennt. Das im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine und führt somit zur Auflösung der Tertiärstruktur. SDS ist ein Anion, komplexiert mit Proteinen und denaturiert diese. Die stark negative Ladung des Komplexes ist in etwa proportional zu der Masse des Proteins und die ursprüngliche Ladung des Proteins kann dadurch vernachlässigt werden. Durch ein angelegtes elektrisches Feld wandern die SDS-Protein-Komplexe unterschiedlich schnell durch die Poren des Gels in Richtung der positiv geladenen Anode. Die Größe der einzelnen Proteine lässt sich im Vergleich zu dem mitgelaufenen Proteingrößenmarker ermitteln (Kapitel 2.7.2).

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde eine Mini-Protean Tetracell Kammer (Biorad, München) mit zugehörigem Gelgießstand verwendet. Die Glasplatten wurden mit 100 % Ethanol gereinigt und in den Gelgießstand eingebaut. Der Zwischenraum der Glasplatten wurde zu 2/3 mit dem flüssigen Trenngel befüllt (siehe Tab. 13) und mit 70 % Ethanol überschichtet um eine gerade, luftblasenfreie Trennschicht herzustellen.

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Ethanol abgeschüttet, der verbleibende Zwischenraum mit Sammelgel aufgefüllt und ein Kamm eingesteckt. Das polymerisierte Gel wurde anschließend in die Elektrophoresekammer eingespannt. Bei dem Befüllen der äußeren Kammer mit SDS-Laufpuffer wurde darauf geachtet, dass am unteren Rand des Gels keine Luftblasen entstehen, da sonst der Stromfluss behindert wird. Die Kammer zwischen den Glasplatten muss bis knapp unter den Rand mit SDS-Laufpuffer

befüllt werden, damit der Stromkreis geschlossen wird. Anschließend wird der Kamm vorsichtig entfernt.

Die aufzutrennenden Proben wurden in 4x Rotiload-Probenpuffer (Roth, Karlsruhe) (Laemmli 1970) aufgenommen, für 5 min bei 100°C aufgeköcht und anschließend in die durch den Kamm entstandenen Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 130 V für ca. 1,5 h bis zum Herauslaufen der Laufront.

Zur spezifischen Detektion von Proteinen über Antikörper wurde das SDS-Gel für einen Western Blot eingesetzt (siehe Kapitel 3.3.3).

10x SDS-Laufpuffer

30 g Tris/HCl

144,4 g Glycin

10 g SDS

ad 1.000 ml H₂O_{dest}

Tab. 13: Rezept für 2 SDS-Minigele (1 mm Gelkammer von Biorad, München).

Zutaten	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
30 % Acrylamid / Bis-Acrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel A; Roth, Karlsruhe)	4,8 ml	1,33 ml
H ₂ O _{dest}	4,2 ml	4,4 ml
Tris-Puffer	3 ml (1,5 M; pH 8,8)	2 ml (0,5 M; pH 6,6)
10 % SDS	120 µl	80 µl
10 % APS (w/v) in H ₂ O _{dest}	60 µl	40 µl
TEMED ¹	10 µl	7,5 µl

¹TEMED führt zur Polymerisation des Acrylamids und wurde erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben.

3.3.3 Western Blot (*semi-dry*-Verfahren)

Nachdem Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt waren, wurden diese mit Hilfe eines Western Blots elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Diese wurde dann mit spezifischen Antikörpern inkubiert um deren Epitope nachzuweisen. Nachweisgrenze liegt bei etwa 1-10 ng Protein. Dazu wurde folgender Versuchsbau durchgeführt.

Zunächst wurden eine, der Größe des Gels entsprechende Nitrozellulose-Membran und sechs Whatman-Papiere mit Towbin-Puffer getränkt. Der Blot wurde auf der mit Towbin-Puffer angefeuchteten Anodenplatte des *Semi-Dry*-Blotters aufgebaut. Auf drei Lagen Whatman-Papier wurde die Nitrozellulose, darüber das Gel und schließlich drei weitere Lagen Whatman-Papier geschichtet. Das Gel darf nach dem Auflegen auf die Membran nicht verrutscht werden, da der Proteintransfer unmittelbar nach dem Auflegen beginnt. Mit einer Glaskapillare und geringem Druck wurde über den Blot gerollt, um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen. Die Blotkammer wurde durch Auflegen der ebenfalls mit Towbin-Puffer angefeuchteten Kathodenplatte verschlossen. Der Transfer wurde für 1 h 15 min bei 0,8 mA pro cm² Membran durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die noch freien Bindungsstellen der Nitrozellulose mit 5 % Milch / TBS für 1 h abgesättigt, einmal für 10 min in TBS-Puffer gewaschen und für 1 h mit dem in 1 % Milch / TBS verdünnten Primär-Antikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Inkubation mit dem ebenfalls in 1 % Milch / TBS verdünnten Meerrettichperoxidase-gekoppelten (*horse raddish peroxidase*, HRP) Sekundär-Antikörper. Auf die drei finalen Waschschrritte folgte die Detektion der Antikörper mittel ECL-Reaktion (Kapitel 3.3.5) oder Farbreaktion (Kapitel 3.3.6).

Towbin-Puffer

3 g Tris

14,4 g Glycin

20 % Methanol

ad 1.000 ml H₂O_{dest}

10x TBS-Puffer

76,5 g NaCl

54 g Tris/HCl

ad 900 ml H₂O_{dest}

pH-Wert auf pH 7,6 einstellen

Lösung autoklavieren

3.3.4 *Stripping* von Nitrozellulose-Membranen

Mit Hilfe einer gering konzentrierten SDS-Lösung und β -Mercaptoethanol können die nicht-kovalenten Antigen-Antikörper-Bindungen wieder aufgelöst werden. Dadurch können Antikörper wieder von der Nitrozellulose-Membran entfernt werden. Eine erneute Protein-Detektion mit anderen Antikörpern wird dadurch möglich.

Dazu wurde die Nitrozellulose in einem Hybridisierungssofen für 30 min bei 55°C in *Stripping*-Puffer inkubiert und anschließend 3 x für 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Schließlich wurde die Membran erneut mit 5 % Milch / TBS abgesättigt. Eine erneute Inkubation mit spezifischen Antikörpern konnte nun durchgeführt werden.

Stripping-Puffer

10 g SDS (2 % [w/v])

3,63 g Tris/HCl (pH 7,6; 62,5 mM)

ad 500 ml mit H₂O_{dest}

unmittelbar vor Gebrauch wird zugegeben:

100 mM β -Mercaptoethanol

Im Weiteren muss beachtet werden, dass neben den gebundenen Antikörpern auch immer ein geringer Teil der Membrangebundenen Proteine entfernt wird. Dadurch kann das zu detektierende Epitop nach dem *Stripping* ein schlechteres Signal aufweisen.

3.3.5 Detektion von Antikörpern mittels ECL-Reaktion

Nachdem die Nitrozellulose mit dem ersten und dem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörpern inkubiert und gewaschen wurden, folgte der Nachweis dieser Antikörper-Epitop-Bindung durch eine Licht-emitierende Reaktion. Dabei setzte die Meerrettich-Peroxidase das in den Reaktionslösungen enthaltene H_2O_2 in H_2O und O_2 um. Der entstandene Sauerstoff oxidierte das enthaltene Luminol, was zur Abstrahlung von Licht führte. Die Inkubation der Membran wurde mit einem 10:1 Gemisch der ECL Entwicklerlösung (GE Healthcare, München) und der Millipore Advanced Entwicklerlösung (Millipore, Schwalbach) für 1 min durchgeführt. Die überschüssige Lösung wurde abgegossen und die Membran in Frischhaltefolie eingepackt. In einer Dunkelkammer wurden die auf die Membran gelegten Röntgenfilme (Fujifilm, Tokio, Japan) belichtet und in einer Agfa Curix 60 Maschine (Agfa, Berlin) entwickelt.

3.3.6 Detektion von Antikörpern mittels Farbreaktion

Im Fall eines zu starken Lichtsignals bei der ECL-Reaktion wurde die Nitrozellulose für 10 min in TBS-Puffer gewaschen um restliche ECL-Lösung zu entfernen. Anschließend wurde eine Farbreaktion mit einer 4-Chloro-1-naphthol-Lösung und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durchgeführt. Die gebundenen Antikörper wurden direkt auf der Membran durch Inkubation mit 3 ml 4-Chloro-1-naphthol und 80 μl H_2O_2 (30 %) in 47 ml TBS detektiert. Die Farbentwicklung wurde durch Austausch der Entwicklerlösung gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ abgestoppt. 4-Chloro-1-naphthol diente in dieser Reaktion als Substrat der Peroxidase, welche an den zweiten Antikörper gekoppelt ist, wobei ein blau-brauner Farbstoff entsteht. Eine weitere Verwendung der Nitrozellulose war nach dieser Reaktion nicht mehr möglich.

4-Chloro-1-naphthol-Lösung

0,3 g in 100 ml Methanol lösen

Lösung wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert

3.4 *In vivo* Experimente

Für die Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (*colony-forming units*, CFU) in allen nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde zum Ausplattieren der *Spiral Plater* und zum Auszählen der *aCOLyte Colony Counter* mit der dazugehörigen Software der Firma *Don Whitley Scientific Limited* (Shipley, England) verwendet. Die statistische Auswertung und die grafische Darstellung wurden mit den Programmen *Microsoft Excel* und *GraphPad Prism* durchgeführt.

3.4.1 Infektion von *A. castellanii*

Acanthamoeba castellanii ist der natürliche Wirt von *Legionella pneumophila*. Dieses Modell dient dazu Auswirkungen von Invasion, Replikation und Evasion näher zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Infektionsversuche durchgeführt. Dazu wurden definierte Zellzahlen von Amöben und Bakterien zusammen in 24-Well-Platten inkubiert. Das Verhältnis von infektiösen Agenzien (Bakterien) zu deren Zielzellen wird als MOI (*multiplicity of infection*) bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine MOI von 0,01 verwendet. Die Infektionsversuche wurden wie folgt durchgeführt.

Aus einer konfluent gewachsenen Flasche wurden die Amöben durch Klopfen abgelöst, in ein 50 ml Röhrchen gegeben und mit PBS auf 40 ml aufgefüllt. 100 µl der Suspension wurden in einem Hämacytometer (C-Chip, DHC-N01, Digital Bio, Peqlab) unter dem Mikroskop ausgezählt. Das 50 ml Röhrchen wurde anschließend bei 800 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Amöben in Infektionsmedium so resuspendiert, dass sie in der gewünschten Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml vorlagen. 1 ml dieser definierten Amöbensuspension wurde nun in die Schalen einer 24-Well-Platte gefüllt. Die Platte wurde für 2 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei sanken die Amöben auf den Boden der Schale und adhärten dort. Pro Stamm und Zeitpunkt wurden zwei Wells (2 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h) verwendet.

Die Bakterien wurden 3 Tage auf BYCE-Nährboden angezogen, mit einer Impföse in Infektionsmedium überführt und resuspendiert. Photometrisch wurde eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt, was einer Zellzahl von 10^9 Bakterien/ml entsprach. Diese Bakteriensuspension wurde dann in einer 1:10 Verdünnungsreihe bis 10^3 Bakterien/ml verdünnt (6 Verdünnungsschritte). Mit dieser Suspension wurden die Amöben infiziert. Die Lösung wurde

noch einmal 1:10 verdünnt um die genaue Zellzahl durch Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) zu ermitteln. Dazu wurde die Verdünnung auf BCYE-Nährboden ausplattiert, für 3 Tage bei 37°C inkubiert und die CFU bestimmt. Der ermittelte Wert entsprach dem Inokulum, also dem 0 h Wert. Das Medium der 24-Well-Platte mit den adhären Amöben wurde abgenommen und jeweils 1 ml der Bakteriensuspension zu den Amöben geben (MOI von 0,01). Der gesamte Ansatz wurde nun für 2 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 2 h Infektion wurde das Medium vorsichtig abgenommen, verworfen und 1 ml frisches Infektionsmedium pro Well dazugegeben. Die Lösung aus dem Well für den 2 h Wert wurde gut resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt, erneut auf BCYE-Nährboden ausplattiert und die CFU bestimmt. Die 24-Well-Platte wurde anschließend wieder bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

In den darauf folgenden Tagen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h und 96 h) jeweils die entsprechenden Wells gut resuspendiert, abgenommen, verdünnt und ausplattiert. Bei einer Infektion mit *L. pneumophila* Wildtyp vermehrten sich die Bakterien täglich um etwa eine *log*-Stufe. Dies musste bei den Verdünnungsschritten beachtet werden damit die CFU noch zu bestimmen war. Bei den verschiedenen Mutanten musste die Verdünnung jeweils experimentell bestimmt und entsprechend angepasst werden.

Infektionsmedium

1 g NaCitrat

10 ml 0,4 M MgSO₄ x 7 H₂O

10 ml 0,25 M Na₂HPO₄ x 7 H₂O

10 ml 0,25 M KH₂PO₄

8 ml 0,05 M CaCl₂ x 2 H₂O

ad 1.000 ml H₂O_{dest}

Lösung autoklavieren

Zugabe mit einem Sterilfilter:

10 ml 0,005 M Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ x 2 H₂O

Lagerung bei 4°C

3.4.2 Re-Infektion von *A. castellanii* über vier Infektionszyklen

Für den Nachweis von geringen Unterschieden im Infektionsverhalten zwischen zwei *Legionella* Stämmen reicht ein einfacher Infektionszyklus nicht aus. Durch Re-Infektion frischer Amöben mit Bakterien, die schon einen Infektionszyklus durchlaufen haben, können diese sehr geringen Differenzen im Infektionsverhalten in ihrer Gesamtheit besser betrachtet werden. Das liegt auch daran, dass diese Unterschiede sich durch mehrere Durchläufe potenzieren können, sodass erst dann ein deutlicher Effekt sichtbar wird. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene *Legionella* Wildtypen und entsprechende Mutanten näher untersucht. Der Versuch wurde in Anlehnung an eine einfache Infektion von *A. castellanii* (siehe Kapitel 3.4.1) wie folgt durchgeführt.

Der Beginn des Versuchs entsprach dem Aufbau der zuvor beschriebenen einfachen Infektion (MOI von 0,01) mit dem Unterschied, dass in der ersten Woche nur die Werte für das Inokulum (0 h Wert) und der Wert nach 3 Tagen (72 h Wert) bestimmt wurden. Nach der Entnahme des 72 h Wertes wurde die 24-Well-Platte erneut für 4 Tage bei 37°C inkubiert. Am Tag 7 wurden frische Amöben mit einer Zellzahl von 10^5 Zellen/ml in einer neuen 24-Well-Platte angesetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Amöben-Bakterien-Suspension der Vorwoche wurde gut resuspendiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde nun mit frischem Infektionsmedium 1:1.000 verdünnt und die CFU wurde bestimmt. Mit dieser Lösung wurden die frisch angesetzten Amöben infiziert und 3 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach den 3 Tagen war die zweite Infektionsrunde durchlaufen. Die CFU wurde erneut bestimmt und die 24-Well-Platte für vier weitere Tage inkubiert. Es folgten noch zwei weitere Infektionsrunden, sodass am Ende vier Zyklen der Re-Infektion betrachtet werden konnten.

3.4.3 Ko-Infektion von *A. castellanii* mit zwei Bakterienstämmen

Ein weiterer Versuchsaufbau dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Verhalten zweier *Legionella* Stämme innerhalb einer Infektion von *A. castellanii* in direkter Konkurrenz zueinander. Dazu wurden in Anlehnung an den zuvor beschriebenen Versuch (siehe Kapitel 3.4.2) Amöben mit zwei Stämmen infiziert und über vier Infektionszyklen beobachtet.

Der Versuchsaufbau ist identisch zu dem bereits genannten mit dem Unterschied, dass zwei verschiedene *Legionella* Stämme auf eine $OD_{600}=1$ mit Infektionsmedium eingestellt wurden. Danach wurden beide Bakteriensuspensionen 1:1 vermischt und anschließend auf eine Bakterienzahl von 10^3 Bakterien/ml verdünnt. Mit dieser Suspension wurden dann Amöben mit 10^5 Zellen/ml (MOI von 0.01) infiziert. Die Infektion und die anschließenden Re-Infektionen von frischen Amöben wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Der wichtigste Unterschied lag in der Bestimmung der CFU. Für den Versuch wurden jeweils ein Wildtyp und eine Mutante, die eine Kanamycin-Resistenzkassette trägt, verwendet. Für jeden Zeitpunkt der CFU-Bestimmung wurden entsprechende Verdünnungen auf BCYE-Nährboden mit und ohne Kanamycin ausplattiert. Die Bakterienzahl auf den normalen BCYE-Nährböden ohne Antibiotikum entsprach der Summe der Bakterien aus Wildtyp und Mutante. Der Wert von den BCYE-Nährböden mit Kanamycin zeigte die CFU der Mutante. Für die Bestimmung der wildtypischen CFU wurde dieser Wert von der Gesamt-CFU abgezogen. Die Zellzahl beider Stämme konnte dadurch bestimmt und analysiert werden.

3.5 Elektronenmikroskopie

3.5.1 Anzucht der Bakterien

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sollten die verschiedenen *Legionella* Stämme und insbesondere der polare Flagellenapparat untersucht werden. Zuvor war bereits bekannt die Expression der Flagelle in *L. pneumophila* temperatur-abhängig ist (Ott et al. 1991). Weiterhin wirken in einem Schüttel-Inkubator sehr starke Scherkräfte, wodurch das Filament der Flagelle sehr leicht brechen kann. Um eine möglichst hohe Zahl an intakten und mit dem Bakterium verbundenen Flagellen zu erhalten, wurde das Kultivierungsprotokoll für Legionellen (siehe Kapitel 3.1.2) leicht modifiziert.

Zunächst wurde eine Vorkultur mit 3 ml YEB-Medium angeimpft und bei 37°C unter normalen Schüttelbewegungen (250 rpm) über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Hauptkultur von 20 ml YEB-Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde anschließend bei 30°C und geringer Schüttelbewegung (125 rpm) angezogen. Da *Legionella* den Flagellenapparat erst in der stationären Phase ausbildet, wurde der Ansatz bis $OD_{600} > 1,6$ inkubiert (etwa 24 h). Zu diesem Zeitpunkt wurden pro Stamm 7,5 ml Suspension abgenommen und durch eine schwache Zentrifugation von 1.000 rpm für 20 min pelletiert. Das Pellet wurde durch vorsichtiges Resuspendieren in 100 ml H_2O_{dest} aufgenommen. Die Bakteriensuspension konnte nun für die Elektronenmikroskopie weiter verwendet werden.

3.5.2 Fixierung und Untersuchung mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Sowohl die Fixierung als auch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung ZBS4 (Elektronenmikroskopie) des Robert Koch-Instituts durchgeführt.

Zur Fixierung der bakteriellen Strukturen wurde zu der wässrigen Suspension im Verhältnis 1:1 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Hepes-Puffer versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert.

Für die Untersuchung der Bakterien mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurden diese auf kleine Kupfer-Trägernetzchen, so genannte *Grids* absorbiert. Dafür waren diese *Grids* mit Pioloform F beschichtet und zur Stabilisierung zusätzlich ein Kohlefilm aufgedampft. Anschließend wurden die adhärenenten Bakterien dreimal mit H_2O_{dest}

gewaschen. Zur Erhöhung des Kontrasts für die Bildgebung eine Negativ-Kontrastierung mit 0,5 % Uranylacetat (pH 4-4,5) oder Phosphorwolframsäure (pH 7-7,5) verwendet. Analysiert wurden die Bakterien mit Hilfe eines TEM 902 (Zeiss, Oberkochen) bei 80 kV. Die Bilder wurden mit einer *slow-scan* CCD-Kamera (Proscan, Scheuring) digitalisiert.

3.5.3 Immunogold-Markierung des Flagellenapparates

Für die genauere Untersuchung der gefundenen *Hook*-Struktur wurde ein polyklonaler Antikörper gegen abgescherte Flagellen verwendet. Als Sekundär-Antikörper wurden polyklonale Antikörper gegen Kaninchen verwendet, die an 5 und 10 nm Goldkügelchen gekoppelt waren. Gold hat eine sehr große Dichte und ist in der Transmissionselektronenmikroskopie als schwarzer Punkt sichtbar. Für die Präparation wurde folgendes Protokoll verwendet.

Zunächst wurden die Bakterien fixiert (siehe Kapitel 3.5.2) und 15 µl dieser Suspension wurden 10 min auf ein Kupfer-*Grid* sedimentiert. Zur Blockierung der Aldehyde wurde 5 min mit 50 mmol Glycerin in PBS inkubiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungen für 20 min mit 0,1 % BSA in PBS (Blockpuffer) abgesättigt. Der Primär-Antikörper wurde 1:10 in 0,1 % BSA / PBS verdünnt und die Proben 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 4 x 2 min Waschen mit Blockpuffer wurde mit dem Sekundär-Antikörper (1:20 verdünnt in Blockpuffer) für 1 h inkubiert. Daraufhin wurde 2 x 5 min mit PBS und 5 x kurz mit H₂O_{dest} gewaschen. Abschließend wurden die Proben mit 0,5 % Uranylacetat negativ-kontrastiert und mittels TEM 902 analysiert (siehe Kapitel 3.5.2).

3.6 *In silico* Auswertung verschiedener Genomsequenzen

3.6.1 Präparation und Sequenzierung von genomischer DNA verschiedener *Legionella* Stämme

Um eine genügend große Menge genomischer DNA der verschiedenen zu sequenzierenden *Legionella* Stämme zu erhalten, wurden 3-4 fache Ansätze mit Hilfe der bereits beschriebenen Methode (siehe Kapitel 3.2.2) isoliert. Anschließend wurden die Ansätze zu gleichen Anteilen vereinigt und vermischt. Für die Sequenzierung wurden insgesamt 30-50 µg Gesamt-DNA in einer minimalen Konzentration von 30 ng/µl benötigt.

Die Sequenzierung der verschiedenen Stämme wurde durch verschiedene Dienstleister durchgeführt. In der Sequenzier-Abteilung des Robert Koch-Instituts wurden die Stämme *L. pneumophila* Togus, *L. bozemanii*, *L. gormanii* und *L. lytica* analysiert, während der Stamm *L. oakridgensis* mit Hilfe der Eurofins MWG GmbH in Ebersberg sequenziert wurde. Die Methode war in beiden Ansätzen die gleiche. Mittels *High-Throughput Sequencing* mit *Paired-Ends* und einer Größe von 500 bp wurden die Genome mit einem *Illumina Genome Analyzer* (San Diego, USA) untersucht. Die sequenzierten DNA-Stücke wurden anschließend mit Hilfe von Referenz-Genomen wie *L. pneumophila* Corby und *L. longbeachae* NSW150 zu größeren DNA-Abschnitten (*Contigs*) zusammengesetzt (*Alignment*). Diese bearbeiteten Rohdaten wurden dann im Rahmen dieser Arbeit weiter bearbeitet und ausgewertet (siehe Kapitel 3.6.2).

3.6.2 *In silico* Analyse von Genomsequenzen

Nach dem Erhalt der Rohdaten wurden die sequenzierten, größeren DNA-Abschnitte (*Contigs*) mit Hilfe der Programme *Geneious Pro* Version 5.5 (Auckland, Neuseeland), *Staden Package* Version 2.0 (Staden 1996) und *Mauve* Version 2.3.1 (Darling et al. 2010) mit verschiedenen bereits bekannten *Legionella* Genomdaten abgeglichen und die *Contigs* neu sortiert. Daraus wurde ein zusammenhängendes Genom erstellt bei dem alle *Contigs* hintereinander sortiert kombiniert wurden. Mit Hilfe von *Artemis* Version 12.0 (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>) (Rutherford et al. 2000) wurde diese Sequenz visualisiert und konnte weiter bearbeitet werden. Dazu gehörte unter anderem das Erstellen der offenen Leserahmen in der Sequenz und Annotationen von Genen und Proteinen innerhalb des Genoms. Um bestimmte kurze DNA-Abschnitte basengenau und

Proteinsequenzen aminosäuregenau miteinander abzugleichen wurden die Programme BLAST (*basic local alignment search tool*; NLM, National Library of Medicine, USA; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *Geneious* (<http://www.geneious.com/>), die *Pedant* Datenbank (<http://pedant.gsf.de/>) und *ClustalW* (Thompson et al. 1994; Larkin et al. 2007) verwendet. Mit letzterem wurden außerdem Dendrogramme für die Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen erstellt. Das Umschreiben von DNA-Sequenzen in den reversen komplementären Strang wurde mit Hilfe von *EditSeq* aus dem *Lasergene* Version 9.0 Programm (DNASTAR, Madison, USA) durchgeführt. Abschließend wurde die grafische Darstellung der Genomdaten mit dem Programm *Photoshop CS3* (Adobe Systems, San Jose, USA) aufgearbeitet.

4. Ergebnisse

4.1 Generierung von spezifischen *knock-out* Mutanten in *L. pneumophila* Corby

Zur Untersuchung der für den Zusammenbau der Flagelle wichtigen Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Insertions- bzw. eine Deletionsmutante hergestellt. Zum einen wurde das Gen *lpc2402* mutiert, ein Gen welches zur Klasse der GGDEF/EAL und PAS/PAC Domänen Proteine gehört. In vorangegangenen Microarray-Analysen wurde FliA als möglicher Regulator für dieses Gen gefunden (Brüggemann et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob *lpc2402* für den Phänotyp der Δ *fliA* Mutante verantwortlich ist. Zum Weiteren wurde das Gen *fliD* mutiert. FliD ist das *Cap*-Protein der Flagelle und befindet sich an dessen distalen Ende. Δ *fliD* Mutanten wurden insbesondere auf mögliche strukturelle Veränderungen der Flagelle hin untersucht.

4.1.1 Herstellung einer Δ *lpc2402* *knock-out* Mutante in *L. pneumophila* Corby

In dieser Arbeit wurde in *L. pneumophila* Corby eine Δ *lpc2402* *knock-out* Mutante generiert, bei der das Gen *lpc2402* durch homologe Rekombination gegen eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde (*Lp* Corby Δ *lpc2402*:Km). Ein schematischer Überblick über die verschiedenen Klonierungsschritte wird in Abb. 18 gezeigt.

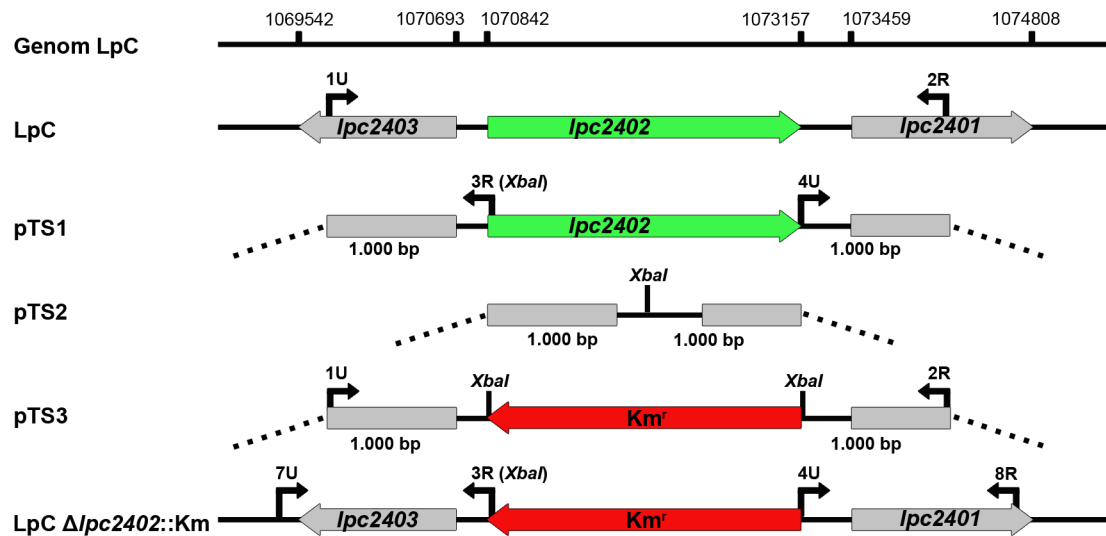


Abb. 18: Herstellung der *L. pneumophila* Corby $\Delta lpc2402::Km$ knock-out Mutante. Die DNA von *lpc2402* von *L. pneumophila* Corby (LpC) wurde mit 1.000 bp flankierenden Bereichen amplifiziert und in den Vektor pGEM Teasy kloniert (pTS1). Durch Inverse PCR wurde die Sequenz von *lpc2402* aus dem Konstrukt entfernt (pTS2) und durch eine Kanamycinresistenzkassette (Km^r) ersetzt (pTS3). Über natürliche Transformation und homologe Rekombination wurde die $\Delta lpc2402$ knock-out Mutante hergestellt (LpC $\Delta lpc2402::Km$ TS A6). Primer: 1U, *lpc2402*_fl 1U; 2R, *lpc2402*_fl 2R; 3R, *lpc2402*_fl Inv 3R (trägt eine *XbaI*-Schnittstelle); 4U, *lpc2402*_fl Inv 4U; 7U, *lpc2402*_Mut_Test 7U; 8R, *lpc2402*_Mut_Test 8R.

Das Gen wurde mit seinen flankierenden Bereichen von etwa 1.000 bp aus der chromosomalen DNA von *L. pneumophila* Corby amplifiziert. Für diese PCR wurden die Primer *lpc2402*_fl 1U und *lpc2402*_fl 2R verwendet. Das Produkt mit einer Größe von 4.622 bp (1.166 bp + 2.316 bp + 1.140 bp) wurde aufgereinigt, in den Vektor pGEM TEasy ligiert und in *E. coli* DH5 α elektroporiert. Die transformierten Klone wurden mittels PCR mit den Primern *lpc2402*_fl 1U und *lpc2402*_fl 2R auf die Aufnahme des Konstrukts hin überprüft (Abb. 19A). Im Weiteren wurde der positive Klon zusätzlich auf die flankierenden Bereiche hin untersucht. Dazu wurde zum einen eine PCR mit den Primern für den *upstream* Bereich *lpc2402*_fl 1U und *lpc2402*_fl Inv 3R und zum anderen eine PCR mit den Primern für den *downstream* Bereich *lpc2402*_fl 2R und *lpc2402*_fl Inv 4U durchgeführt (Abb. 19B). Nach positiven Ergebnissen wurde dieser Vektor pTS1 genannt. Durch eine Inverse PCR mit den Primern *lpc2402*_fl Inv 3R und *lpc2402*_fl Inv 4U wurde das isolierte Plasmid linearisiert. Das PCR-Produkt von 5.310 bp enthielt die Vektor-DNA mit den flankierenden Regionen von

lpc2402 ohne das Gen selbst (3.015 bp + 1.166 bp + 1.140 bp) (Abb. 19C). Außerdem wurde mit Hilfe des Primers *lpc2402_fl Inv 3R* eine *XbaI* Schnittstelle in das Konstrukt eingefügt.

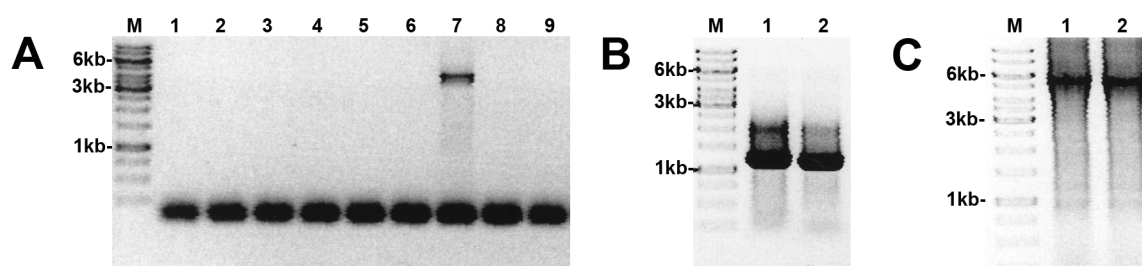


Abb. 19: Klonierung des Gens *lpc2402* in den Vektor pGEM TEasy, Überprüfung der flankierenden Bereiche und Inverse PCR. (A) Kontroll-PCR zur Generierung von pTS1 (Gen *lpc2402* mit ca. 1.000 bp flankierenden Sequenzen in Vektor pGEM TEasy), Primer: *lpc2402_fl 1U* und *lpc2402_fl 2R*, Produkt: 4.622 bp, positiver Klon: Spur 7. (B) Kontroll-PCR von pTS1 (Klon 7) zur Überprüfung der flankierenden Bereiche, Primer (*upstream*, Spur 1): *lpc2402_fl 1U* und *lpc2402_fl Inv 3R*, Produkt: 1.166 bp, Primer (*downstream*, Spur 2): *lpc2402_fl 2R* und *lpc2402_fl Inv 4U*, Produkt: 1.129 bp. (C) Die Inverse PCR von pTS1 führte zu einem linearisierten PCR-Produkt aus den flankierenden Bereichen und der Sequenz des Vektors pGEM TEasy. Primer: *lpc2402_fl Inv 3R* (trägt eine *XbaI*-Schnittstelle) und *lpc2402_fl Inv 4U*, Produkt: 5.310 bp, Ergebnis der PCR: Spur 1,2. Größenstandard: M, 1 kb DNA-Marker.

Nach der Elution der entsprechenden Bande aus einem Agarose-Gel wurde zusätzlich ein *DpnI*-Verdau durchgeführt. Dieser diente zum Verdau des ringförmigen „Elternplasmids“ um eine mögliche Kontamination auszuschließen. Die anschließende Klenow-Behandlung ermöglichte die Religation des Konstruktes. Das erhaltene Plasmid wurde in *E. coli* DH5 α elektroporiert und reisoliert. Zur Überprüfung wurden die Transformanten mittels Kontroll-PCR und den Primern *lpc2402_fl 1U* und *lpc2402_fl 2R* überprüft (Abb. 20A). Da es vorkommen kann, dass ein flankierender Bereich doppelt oder nur zum Teil in den Vektor inseriert, wurden die positiven Klone anschließend auf beide flankierenden Sequenzen hin überprüft. Pro Klon wurde jeweils eine PCR mit den Primern für den *upstream* und den *downstream* Bereich durchgeführt (Abb. 20B). Es konnten 3 positive Klone isoliert werden und das Konstrukt wurde pTS2 (#4, #8, #12) genannt.

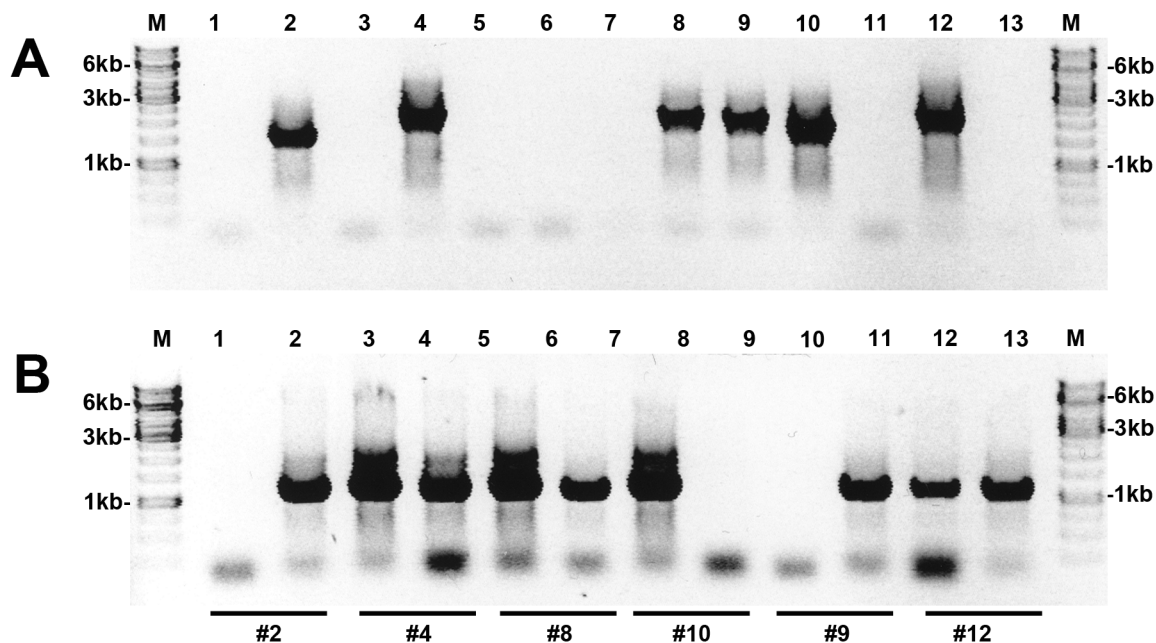


Abb. 20: Überprüfung des Konstrukte nach der Religation der Inversen PCR (pTS2). (A) Kontroll-PCR der Religation nach der Inversen PCR. Primer: *lpc2402_fl* 1U und *lpc2402_fl* 2R, Produkt: 2.295 bp, positive Klone: 2, 4, 8, 9, 10, 12. (B) Kontroll-PCR zur Überprüfung auf Vorhandensein der flankierenden Bereiche. Pro Klon jeweils 2 Primerkombinationen. Primer der jeweils 1. Spur (*upstream*): *lpc2402_fl* 1U und *lpc2402_fl* Inv 3R, Produkt: 1.166 bp. Primer der jeweils 2. Spur (*downstream*): *lpc2402_fl* 2R und *lpc2402_fl* Inv 4U, Produkt: 1.129 bp. Positive Klone aus beiden Ansätzen: 4, 8, 12. Größenstandard: M, 1 kb DNA-Marker.

Um eine Km^r Kasette zwischen die flankierenden Regionen, anstelle des *lpc2402*, einzufügen, wurde in den Vektor pTS2 eine *Xba*I-Schnittstelle eingefügt. Durch einen *Xba*I-Restriktionsverdau von pTS2 und pChA12, dem Trägerplasmid der Km^r Kasette, wurde zum einen der Vektor pTS2 linearisiert und zum anderen die Km^r Kasette aus dem Ursprungsplasmid herausgeschnitten. Abb. 21A zeigt die Resistenzkasette als Bande bei etwa 1.400 bp. Der Verdau der pTS2 Konstrukte zeigt, dass Klon #12 nicht verdaut werden konnte. In diesem Fall ist zu vermuten, dass es zu einer Punktmutation innerhalb der *Xba*I-Schnittstelle gekommen ist. Dieser Klon wurde im Weiteren verworfen. Die Klone #4 und #8 wurden erfolgreich verdaut und jeweils für die Religation mit der Km^r Kasette verwendet. Nach der Ligation und anschließender Aufreinigung wurden die Konstrukte in *E. coli* DH5 α elektroporiert und die Plasmide reisoliert. In beiden Ligationen konnten mit einer Kontroll-PCR und den Primern *lpc2402_fl* 1U und *lpc2402_fl* 2R positive Klone detektiert werden (Abb. 21B, C). Das erhaltene Konstrukt wurde pTS3 genannt.

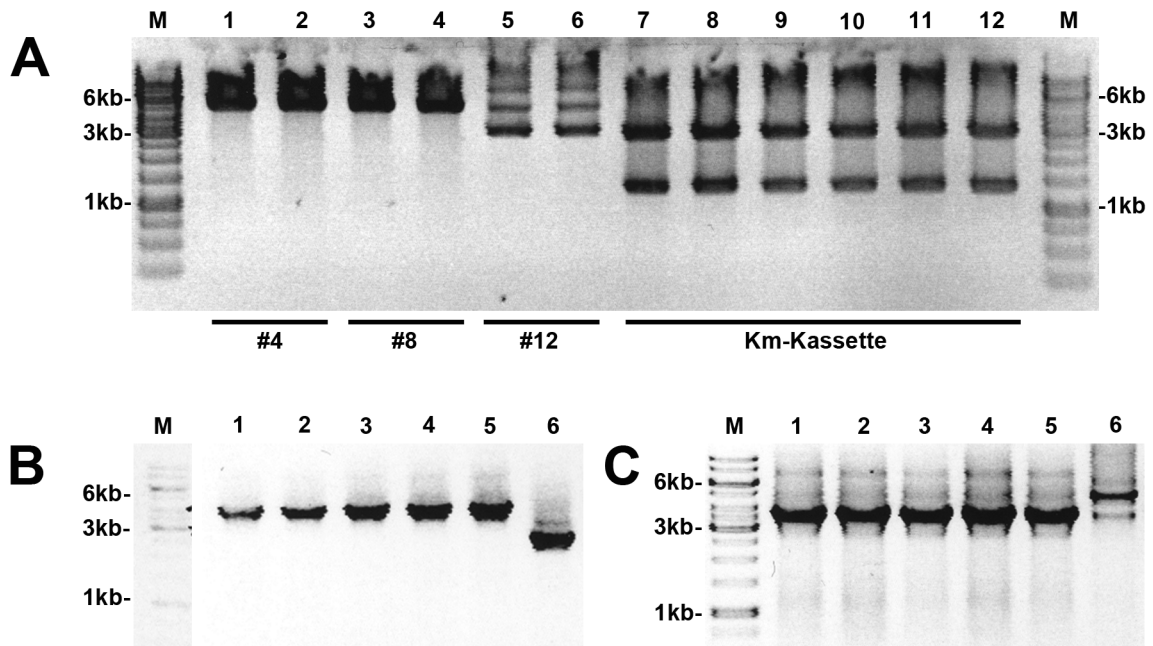


Abb. 21: Restriktionsverdau und Kontroll-PCR zur Generierung von pTS3 durch Religation und Insertion einer Km^r Kasette in pTS2. (A) Restriktionsverdau der Konstrukte pTS2 #4, #8, #12 und pChA12 (Km^r Kasette). Erfolgreicher Verdau mittels *Xba*I von pTS2 #4, #8 und pChA12 (Spur 1-4, 7-12). (B) Kontroll-PCR nach Ligation von pTS2 #4 und Km^r Kasette. Primer: lpc2402_fl 1U und lpc2402_fl 2R, Produkt: 3.695 bp, positive Klone: Spur 1, 2, 3, 4, 5. (C) Kontroll-PCR nach Ligation von pTS2 #8 und Km^r Kasette. Primer: lpc2402_fl 1U und lpc2402_fl 2R, Produkt: 3.695 bp, positive Klone: Spur 1, 2, 3, 4, 5. Größenstandard: M, 1 kb DNA-Marker.

Für die anschließende Deletion des Gens *lpc2402* im Genom wurden die flankierenden Regionen mit inserierter Km^r Kasette mit den Primern lpc2402_fl 1U und lpc2402_fl 2R amplifiziert und das gereinigte PCR-Produkt mittels natürlicher Transformation und homologer Rekombination in *L. pneumophila* Corby eingebracht. Positive Transformanden konnten durch eine Kontroll-PCR mit den Primern lpc2402_fl 1U und lpc2402_fl 2R ausgehend von beiden Konstrukten (pTS3#4 bzw. #8) gefunden werden (Abb. 22A bzw. B).

Um sicherzustellen, dass die homologe Rekombination innerhalb des Genoms nur das Gen *lpc2402* betroffen hat und das Konstrukt nicht an anderer Stelle im Genom inseriert hat, wurde jeder Klon durch PCRs mit 3 verschiedenen Primerkombinationen überprüft. Dazu wurden Primer verwendet, die außerhalb der zuvor klonierten Bereiche liegen. Jeweils ein Primer bindet *upstream* und ein anderer *downstream* dieser Bereiche. Durch die jeweilige

Kombination mit Primern innerhalb der Konstruktes kann auf den Insertionsort rückgeschlossen werden. Bei einer beliebigen Insertion innerhalb des Genoms wäre kein PCR-Produkt detektierbar (Abb. 22C, D; pro Klon jeweils die 1. und 2. Spur). Um mögliche Mehrfachinsertionen an einer Stelle auszuschließen, wurde im Weiteren eine PCR mit Primern durchgeführt, welche das gesamte klonierte Konstrukt umschließen. Ein wildtypisches PCR-Produkt hätte eine Größe von etwa 5.000 bp, während ein PCR-Produkt eines Stammes mit deletiertem *lpc2402* eine Größe von ca. 4.000 bp hätte (Abb. 22C, D; pro Klon jeweils die 3. Spur). Es konnten in beiden Transformationsansätzen korrekte $\Delta lpc2402::Km$ Mutanten detektiert werden. Für die weiteren Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurde die Mutante #6 aus dem Transformationsansatz pTS3 #4 verwendet und als $\Delta lpc2402::Km$ TS A6 bezeichnet.

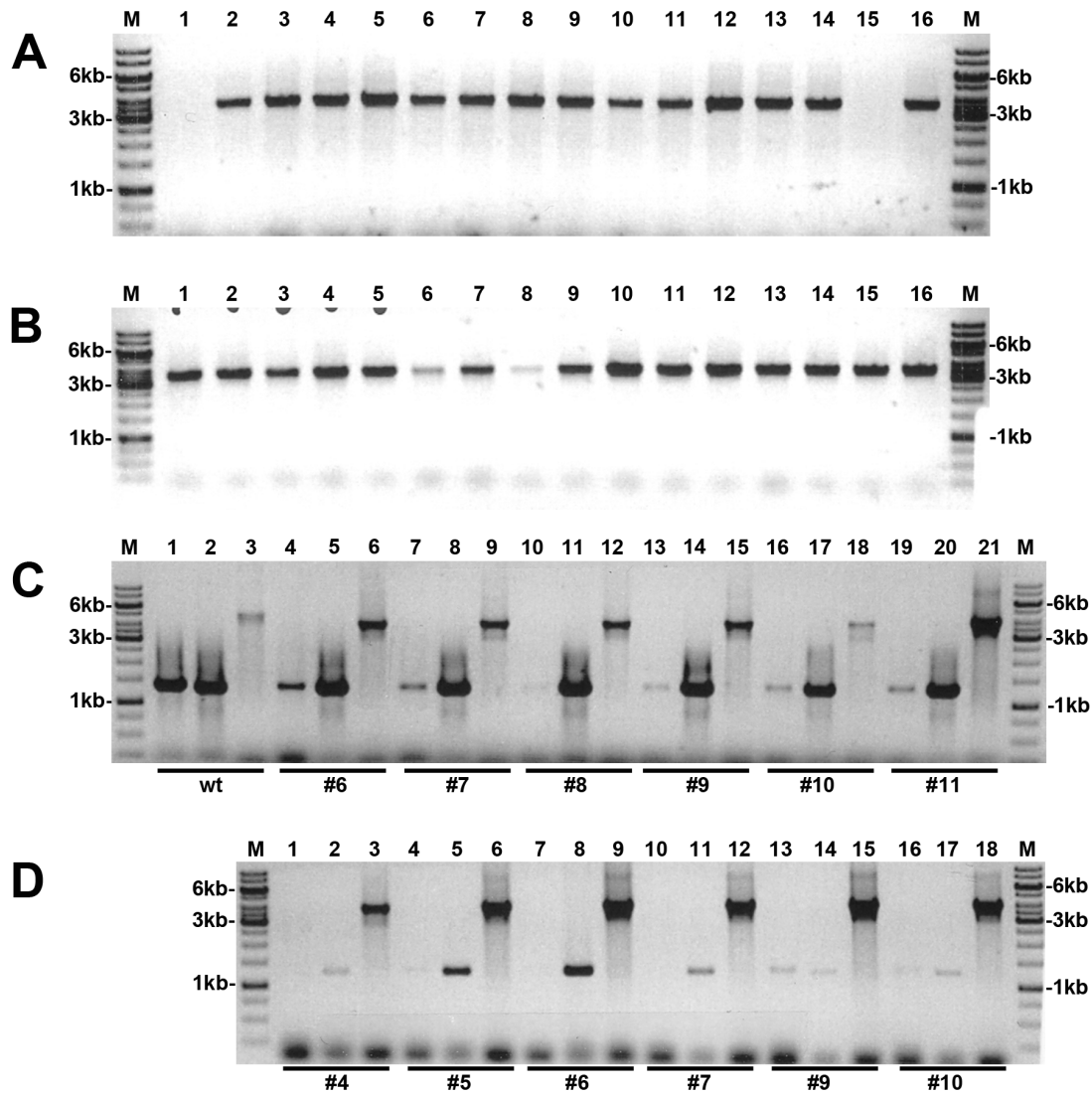


Abb. 22: Generierung der $\Delta lpc2402$ knock-out Mutante ($lpc2402::Km$) und Überprüfung des Insertionsortes. (A) Kontroll-PCR der $\Delta lpc2402$ Mutante aus dem Konstrukt pTS3#4, Primer: $lpc2402_fl$ 1U und $lpc2402_fl$ 2R, Produkt: 3.695 bp, positive Klon: Spur 2-14, 16. (B) Kontroll-PCR der $\Delta lpc2402$ Mutante aus dem Konstrukt pTS3#8, Primer: $lpc2402_fl$ 1U und $lpc2402_fl$ 2R, Produkt: 3.695 bp, positive Klon: Spur 1-16. (C, D) Kontroll-PCR zur Überprüfung des Insertionsortes im Genom. Pro Klon jeweils 3 Primerkombinationen (PK). 1. PK: $lpc2402_Mut_Test$ 7U und $lpc2402_fl$ Inv 3R, Produkt: ca. 1.300 bp; 2. PK: $lpc2402_Mut_Test$ 8R und $lpc2402_fl$ Inv 4U, Produkt: ca. 1.300 bp; 3. PK: $lpc2402_Mut_Test$ 7U und $lpc2402_Mut_Test$ 8R, Produkt: ca. 5.000 bp (Wildtyp) und ca. 4.000 bp ($\Delta lpc2402$). (C) Kontroll-PCRs mit *L. pneumophila* Corby, Spur 1-3; $\Delta lpc2402$ Mutante aus pTS3#4, Klon #6 (Spur 4-6), Klon #7 (Spur 7-9), Klon #8 (Spur 10-12), Klon #9 (Spur 13-15), Klon #10 (Spur 16-18), Klon #11 (Spur 19-21). (D) Kontroll-PCRs mit $\Delta lpc2402$ Mutante aus pTS3#8, Klon #4 (Spur 1-3), Klon #5 (Spur 4-6), Klon #6 (Spur 7-9), Klon #7 (Spur 10-12), Klon #9 (Spur 13-15), Klon #10 (Spur 16-18). Größenstandard: M, 1 kb DNA-Marker.

4.1.2 Herstellung einer $\Delta fliD$ knock-out Mutante in *L. pneumophila* Corby

Im Rahmen dieser Arbeit wurden strukturelle Untersuchungen der Flagelle durchgeführt. Für diese Studien wurde eine Insertionsmutante des *Cap*-Proteins der Flagelle FliD erstellt. Das Konstrukt pGEM- $\Delta fliD$ -gent mit der Sequenz von *fliD* und einer inserierten Gentamycin-Kassette wurde freundlicherweise von Michele S. Swanson zur Verfügung gestellt. Das Gen *fliD* trägt natürlicherweise eine *EcoRI* Schnittstelle an welcher eine 1.700 bp große Gm^r Kassette eingefügt wurde (Molofsky et al. 2005).

Zunächst wurde das Konstrukt aus dem Vektor pGEM- $\Delta fliD$ -gent mit den Primern FliD_Mut_Test 1U und FliD_Mut_Test 2R amplifiziert. Das Produkt war 3.335 bp groß, während eine PCR mit *L. pneumophila* Corby eine Größe von 1.635 bp zeigte, also 1.700 bp weniger (Abb. 23A). Das PCR-Produkt mit der inserierten Resistenzkassette wurde mittels natürlicher Transformation in den Wildtyp-Stamm eingebracht. Durch homologe Rekombination wurde das Gen *fliD* unterbrochen. Überprüft wurde dies durch eine PCR mit den Primern FliD_Mut_Test 1U und FliD_Mut_Test 2R. Es konnten positive Klone mit einer Größe von 3.335 bp detektiert werden (Abb. 23B).

Schließlich wurde der Insertionsort des Konstruktes mit den Primern, FliD_Mut_Test 3U und FliD_Mut_Test 4R, welche außerhalb der klonierten Bereiche binden, überprüft. Pro Klon wurden 4 verschiedene Primerkombinationen (PK) gewählt. Die 1. PK (jeweils 1. Spur) waren die Primer FliD_Mut_Test 1U und FliD_Mut_Test 2R mit einem wildtypischen Produkt von 1.635 bp. Die 2. PK (2. Spur) hatte die Primer FliD_Mut_Test 1U und FliD_Mut_Test 4R und ein Produkt von 2.547 bp und die 3. PK (3. Spur) die Primer FliD_Mut_Test 3U und FliD_Mut_Test 2R und ein Produkt von 3.058 bp. Schließlich die 4. PK (4. Spur) mit FliD_Mut_Test 3U und FliD_Mut_Test 4R und dem Produkt von 3.970 bp. Bei inserierter Gm^r Kassette und somit unterbrochener *fliD* Expression waren die Produkte jeweils um 1.700 bp größer. Sowohl der Wildtyp als auch die untersuchten $\Delta fliD$ Mutanten zeigten die entsprechenden Ergebnisse (Abb. 23C). Für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit wurde der Klon #1 verwendet und als $\Delta fliD$:Km TS1 bezeichnet.

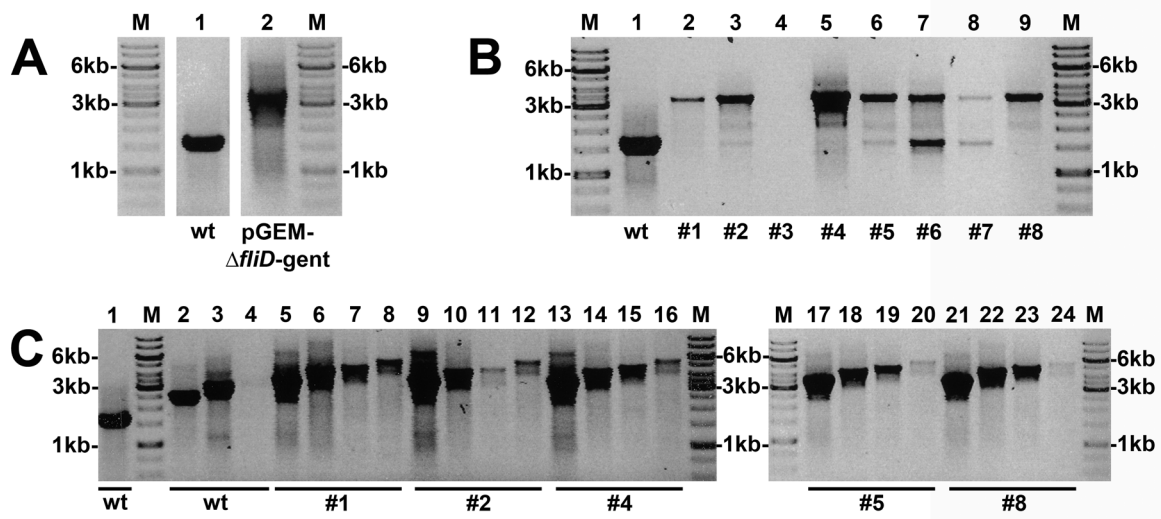


Abb. 23: Generierung einer $\Delta fliD$ Insertionsmutante. (A) PCR für die natürliche Transformation. Mit den Primern *FliD_Mut_Test 1U* und *FliD_Mut_Test 2R* konnte im *L. pneumophila* Wildtyp ein Produkt von 1.635 bp detektiert werden, während der Vektor *pGEM- $\Delta fliD$ -gent*, welcher das Gen *fliD* mit einer inserierten, 1.700 bp großen *Gm^r* Kasette ein Produkt von 3.335 bp enthält. Letztes wurde für die natürliche Transformation verwendet. (B) Klonierung einer *fliD::Km* Insertionsmutante. Kontroll-PCR zur homologen Rekombination der aus *pGEM- $\Delta fliD$ -gent* amplifizierten DNA. Primer: *FliD_Mut_Test 1U* und *FliD_Mut_Test 2R*, Produkt: 3.335 bp, *L. pneumophila* Corby: Spur 1, positive Klone: 1, 2, 4, 5, 8. (C) Überprüfung des Insertionsortes im Genom der $\Delta fliD$ Mutanten. Die Primer *FliD_Mut_Test 3U* und *FliD_Mut_Test 4R* binden außerhalb der klonierten Bereiche. Pro Klon wurden jeweils 4 verschiedene Primerkombinationen (PK) getestet. 1. PK (jeweils 1. Spur): *FliD_Mut_Test 1U* und *FliD_Mut_Test 2R*, Produkt (Wildtyp): 1.635 bp; 2. PK (2. Spur): *FliD_Mut_Test 1U* und *FliD_Mut_Test 4R*, Produkt (Wt): 2.547 bp; 3. PK (3. Spur): *FliD_Mut_Test 3U* und *FliD_Mut_Test 2R*, Produkt (Wt): 3.058 bp; 4. PK (4. Spur): *FliD_Mut_Test 3U* und *FliD_Mut_Test 4R*, Produkt (Wt): 3.970 bp; bei inserierter *Gm^r* Kasette waren die Produkte jeweils um 1.700 bp größer. *L. pneumophila* Corby: Spur 1-4, positive Klone: 1, 2, 4, 5, 8. Größenstandard: M, 1 kb DNA-Marker.

4.2 Phänotypische Analyse von *L. pneumophila*

L. pneumophila findet man natürlicherweise in Frischwasserhabitaten, wo die Bakterien freilebend oder assoziiert mit Protozoen vorkommen. Doch auch in künstlichen, vom Menschen gemachten Wassersystemen sind sie weit verbreitet. Auch dort können die Bakterien autonom oder in Wirtszellen vorkommen. Ein Wirtsmodellorganismus für *Legionella* ist das Protozoon *Acanthamoeba castellanii*. Die Amöbe ist einfach unter Laborbedingungen zu halten und die Bakterien können sich gut in diesen Zellen vermehren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl verschiedene wildtypische *Legionella* Stämme als auch unterschiedliche Regulationsmutanten innerhalb des Flagellenregulons in Bezug auf Vermehrung *in vitro* und *in vivo* untersucht. Mögliche Unterschiede im Infektionsverhalten und dem intra- und extrazellulären Wachstum wurden näher charakterisiert. Frühere Studien konnten bereits Defizite bei der Replikation der $\Delta fliA$ und der $\Delta flaA$ Mutante zeigen (Heuner et al. 2002; Molofsky et al. 2005). Trotz ihrer zentralen Funktion für die Regulation des Flagellenapparates und der damit assoziierten Virulenz konnte weder für die $\Delta rpoN$ noch die $\Delta fleQ$ Mutante eine verminderte Fitness in Infektionsversuchen von Amöben oder humanen Zelllinien gezeigt werden (Heuner et al. 2002; Jacobi et al. 2004; Albert-Weissenberger et al. 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Stämme in verschiedenen, erst vor kurzem entwickelten Infektionsassays untersucht werden (Eylert et al. 2010). Dazu wurden zu Beginn das Wachstum der verschiedenen Stämme in Flüssig-Medium untersucht. Im Weiteren wurden Infektionsversuche mit *A. castellanii* durchgeführt. Sowohl einfache als auch mehrfache Infektionsrunden wurden näher betrachtet. Schließlich wurden Infektionsversuche mit zueinander in Konkurrenz stehenden Bakterienstämmen durchgeführt und das mögliche Verdrängen innerhalb einer Infektionsrunde untersucht. Durch diese Versuche wurden die unterschiedlichen Einflüsse der Regulatorproteine und deren Auswirkungen auf das Infektions- und Replikationsverhalten der Bakterien näher charakterisiert.

4.2.1 Wachstum von *L. pneumophila* *in vitro*

Legionella pneumophila Corby Wildtyp und verschiedenen Mutanten wurden in YEB-Medium bei 37°C angezogen. Zu den mutierten Genen gehören wichtige Regulatoren wie RpoN, FleQ und FliA - drei zentrale „Schalter“ in der Regulationskaskade der Flagelle. Weiterhin gehören dazu das Strukturprotein der Flagelle, das Flagellin (FlaA) (Heuner et al. 2000) und das Gen *lpc2402*. Die Funktion von letzterem ist nicht näher bekannt, aber ein Zusammenhang mit der verminderten Invasionsfähigkeit der $\Delta fliA$ Mutante wurde vermutet und im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht (Brüggemann et al. 2006; Albert-Weissenberger et al. 2010).

Das Wachstum der Bakterien *in vitro* wurde über anderthalb Tage untersucht. In dieser Zeit durchliefen die Legionellen einen kompletten Lebenszyklus, von der replikativen bis zur stationären Phase. Zu unterschiedlich definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen um „beispielhaft“ einen Einblick in die exponentielle, die späte exponentielle, die postexponentielle und die stationäre Phase der Bakterien zu zeigen (Abb. 24, Pfeile). Die Proben wurden aufbereitet und mit Hilfe von RT-PCR und Western Blot Analysen untersucht (Kapitel 4.3). Man konnte im Wachstum zwischen den verschiedenen Stämmen keine Unterschiede beobachten. Trotz der Deletion wichtiger regulatorischer Gene wie *rpoN*, *fleQ* und *fliA* konnte kein verzögertes oder gar beschleunigtes Wachstum detektiert werden. Das Replikationsverhalten der gezeigten Stämme war annähernd gleich und auf dem Niveau des wildtypischen Stammes *L. pneumophila* Corby. Auch der Eintritt in die stationäre Phase geschah zeitgleich. Durch das Wachstum in Vollmedium konnten stamm-spezifische Unterschiede nicht gefunden werden. Dieser Versuch diente somit auch als Kontrolle auf mögliche Wachstumsdefekte *in vitro*. Nachfolgende Kapitel betrachten das Wachstum der Stämme *in vivo*.

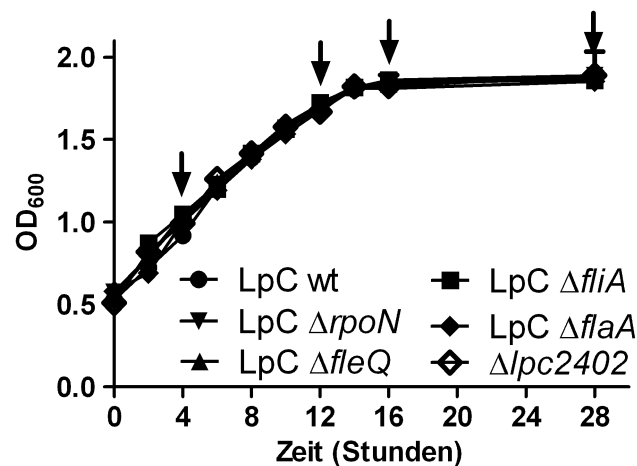


Abb. 24: Replikation von *L. pneumophila* Corby (LpC) und verschiedener Mutanten in YEB-Medium. Die Bakterien wurden in YEB-Medium bei 37°C für 30 h angezüchtet. Zu verschiedenen Zeitpunkten und entsprechenden Wachstumsphasen wurden Proben abgenommen (siehe Pfeile). Diese Proben wurden im Weiteren für RT-PCR Experimente und Western Blot Analysen genutzt. $OD_{600}=1,0$ wurde definiert als exponentielle Wachstumsphase; für die späte exponentielle Phase wurden die Kulturen weitere 8 Stunden inkubiert und bei $OD_{600}\sim 1,7$ Proben abgenommen; für die postexponentielle Phase inkubierten die Bakterien weitere 4 Stunden und wurden bei $OD_{600}\sim 1,8$ geerntet; Proben der stationären Phase wurden nach 12 Stunden weiteren Wachstums und $OD_{600}\sim 2,0$ abgenommen. Gezeigt werden die Mittelwerte mit \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. Symbole: schwarzer Kreis (●), *L. pneumophila* Corby Wildtyp; nach unten zeigendes schwarzes Dreieck (▼), LpC $\Delta rpoN$ Mutante; nach oben zeigendes schwarzes Dreieck (▲), LpC $\Delta fleQ$ Mutante; schwarzes Viereck (■), LpC $\Delta fliA$ Mutante; schwarze Raute (◆), LpC $\Delta flaA$ Mutante; weiße Raute (◇), LpC $\Delta lpc2402$ Mutante.

4.2.2 Wachstum von *L. pneumophila* in vivo

Im Weiteren wurde der natürliche Wirt *Acanthamoeba castellanii* mit den, in Kapitel 4.2.1 beschriebenen, Stämmen infiziert. Hierbei wurde das Replikationsverhalten der Legionellen untersucht, das heißt wie gut die Bakterien ihren Wirt infizieren, sich innerhalb des Wirtes gegen mögliche Abwehrreaktionen durchsetzen und eine Infektion stabil etablieren ohne direkt von der Wirtszelle verdaut zu werden.

Der Wildtyp *Lp* Corby und die Mutanten $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta fliA$, $\Delta flaA$ und $\Delta lpc2402$ wurden auf die gleiche Zellzahl eingestellt und *A. castellanii* anschließend mit einer MOI von 0,01 infiziert. Das Gemisch wurde 2 h inkubiert und danach wurden extrazelluläre Bakterien durch mehrere Waschschrte entfernt. Alle 24 h wurde die Anzahl der Bakterien bestimmt und grafisch ausgewertet (Abb. 25). Man erkennt, dass nicht alle wildtypischen Bakterien

(Abb. 25, LpC wt) nach 2 h von den Amöben aufgenommen wurden. Nur etwa 10 % der Legionellen konnten den Wirt infizieren. In den darauf folgenden 2 Tagen konnte sich der Wildtyp jeweils um etwa 2 *log*-Stufen vermehren. Zu diesem Zeitpunkt waren die Amöben abgekugelt und angefüllt mit Bakterien. Aufgrund der geringen MOI von 0,01 und der Dauer eines Infektionszyklusses von ca. 24 h kam es zu erneuten Infektionen noch uninfizierter Amöben. Zum Ende des Zyklus sinkt in der Wirtszelle das Nährstoffangebot und die Legionellen gehen nun in die transmissive Phase über. Innerhalb der anschließenden 3 Tage kam es somit zur Freisetzung der Bakterien, dem Absterben des Wirtes (nach ca. 24 h, mikroskopisch beobachtet, nicht gezeigt) und zur Infektion weiterer Wirtszellen. Die Stämme $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta flaA$ und $\Delta lpc2402$ zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein identisches Verhalten. Die $\Delta fliA$ Mutante zeigte zu Beginn der intrazellulären Replikation ein vermindertes Wachstum. Ein Invasionsdefekt der $\Delta fliA$ Mutante aus *Lp* Corby wurde bereits beschrieben (Abb. 25, LpC $\Delta fliA$) (Heuner et al. 2002). Die $\Delta fliA$ Mutante konnte diesen Defekt aber innerhalb von 3 Tagen annähernd wieder aufholen und zeigt an Tag 4 eine ähnliche Zellzahl wie der Wildtyp.

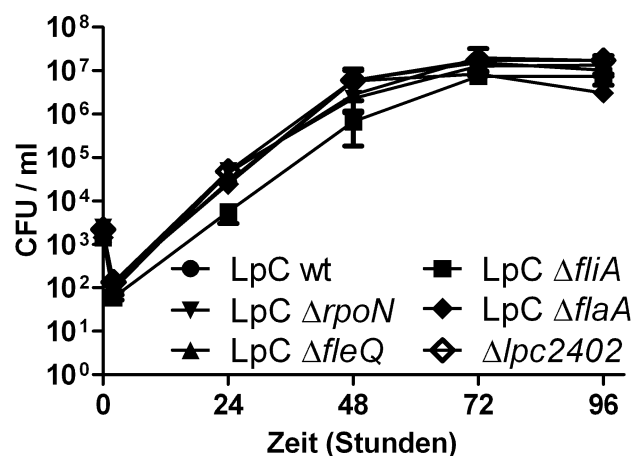


Abb. 25: Replikation von *L. pneumophila* Corby (LpC) und verschiedener Mutanten in *Acanthamoeba castellanii*. Axenisch gewachsene Amöben wurden mit Bakterien und einer MOI (multiplicity of infection) von 0,01 infiziert, nach 2 h gewaschen und für 4 Tage bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (colony-forming units; CFU) wurden das Inokulum und die resuspendierten Bakterien nach 2 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h auf BCYE Agarplatten ausplattiert und für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Gezeigt werden die Mittelwerte mit +/- Standardabweichung von Doppelansätzen und drei unabhängigen Experimenten. Symbole: schwarzer Kreis (●), *L. pneumophila* Corby Wildtyp; nach unten zeigendes schwarzes Dreieck (▼), LpC $\Delta rpoN$ Mutante; nach oben zeigendes schwarzes Dreieck (▲), LpC $\Delta fleQ$ Mutante; schwarzes Viereck (■), LpC $\Delta fliA$ Mutante; schwarze Raute (◆), LpC $\Delta flaA$ Mutante; weiße Raute (◇), LpC $\Delta lpc2402$ Mutante.

Anhand einer einfachen Infektion konnten trotz des Fehlens regulatorischer und struktureller Proteine keine besonders starken Defizite im Infektionsverhalten der verschiedenen Stämme gezeigt werden. Bis auf $\Delta fliA$ zeigten alle Stämme ein ähnliches Verhalten wie der Wildtyp. Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung beim Umschalten des Lebenszyklus von *L. pneumophila* von der replikativen zur transmissiven Phase wäre besonders bei den Mutanten der Regulationsproteine RpoN, FleQ und auch FliA ein stärkerer Effekt zu erwarten. Allerdings konnte bereits in früheren Arbeiten ein ähnliches Replikationsverhalten der $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ Mutante in einer humanen Makrophagenzelllinie (U937) und für die $\Delta fliA$ Mutante in Amöben gezeigt werden (Heuner et al. 2002; Jacobi et al. 2004).

Um zusätzliche Effekte, welche mittels einfacher Infektion gar nicht oder nur sehr schwach zu detektieren sind, zu verstärken, wurden mehrere Infektionszyklen hintereinander durchgeführt. Hierbei wurde nach einem vollständigen Infektionszyklus von drei Tagen das Gemisch aus Resten der Amöben und freischwimmenden Bakterien für weitere vier Tage inkubiert, verdünnt und damit anschließend frisch angesetzte Amöben neu infiziert. Eine Vermehrung der freilebenden Legionellen innerhalb des Infektionspuffers konnte durch vorangehende Versuche ausgeschlossen werden (nicht gezeigt). Es wurde im Weiteren die Anzahl der Bakterien nur noch zu Beginn und zum Ende der jeweiligen Infektionsrunde bestimmt.

Nach vier Wochen mit jeweils einer Infektionsrunde konnten am Ende der Wildtyp und alle Mutantenstämme im gleichen Maße nachgewiesen werden (Abb. 26). Man kann gut die Vermehrung um fast vier *log*-Stufen innerhalb von drei Tagen erkennen. Auch nach mehrmaliger Reinfektion von frischen Amöben konnte kein akkumulierender Effekt bei einer der Mutanten nachgewiesen werden. Die Fähigkeit der Mutanten sich immer wieder erneut gegen den Wirt *Acanthamoeba* durchzusetzen entsprach der des Wildtyps. Der schwache Invasionsdefekt der $\Delta fliA$ Mutante konnte aufgrund der im Vergleich zum vorangegangenen Versuch geringen Messzeitpunkte nicht gezeigt werden. Auch konnte kein sich verstärkender Effekt nach erneuter Infektion nachgewiesen werden (Abb. 26, LpC $\Delta fliA$). Zum Ende des Versuches kam es in allen Stämmen zu einer stärkeren Abweichung vom Mittelwert. Dies kann durch kleinere Ungenauigkeiten beim Verdünnen oder durch das Ausplattieren der Gemische erklärt werden. Ein tatsächlicher Effekt aufgrund der stammspezifischen Eigenschaften müsste mit der Zeit stärkere Auswirkungen haben.

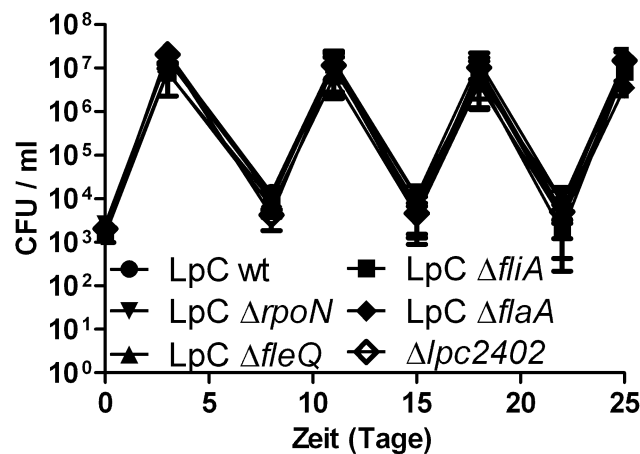


Abb. 26: Replikation mit Re-Infektion über 4 Wochen von *L. pneumophila* Corby (LpC) und verschiedenen Mutanten in *A. castellanii*. Axenisch gewachsene Amöben wurden mit Bakterien und einer MOI von 0,01 infiziert, nach 2 h gewaschen und für drei Tage bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der kolonie-bildenden Einheiten (CFU) wurden das Inokulum und die resuspendierten Bakterien nach 3 Tagen auf BCYE Agarplatten ausplattiert und für drei Tage bei 37°C inkubiert. Die resuspendierten Bakterien wurden für weitere vier Tage bei 37°C inkubiert und anschließend 1:1.000 verdünnt um frische Amöben erneut zu infizieren. Dieser Zyklus wurde viermal wiederholt. Gezeigt werden die Mittelwerte mit +/- Standardabweichung von Doppelansätzen und drei unabhängigen Experimenten. Symbole: schwarzer Kreis (●), *L. pneumophila* Corby Wildtyp; nach unten zeigendes schwarzes Dreieck (▼), LpC $\Delta rpoN$ Mutante; nach oben zeigendes schwarzes Dreieck (▲), LpC $\Delta fleQ$ Mutante; schwarzes Viereck (■), LpC $\Delta fliA$ Mutante; schwarze Raute (◆), LpC $\Delta flaA$ Mutante; weiße Raute (◇), LpC $\Delta lpc2402$ Mutante.

4.2.3 Konkurrierendes Wachstum in *A. castellanii*

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl bei den Regulationsmutanten $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ als auch bei der $\Delta flaA$ und der $\Delta lpc2402$ Mutante in Replikationsversuchen in YEB-Medium und in Infektionsversuchen in *A. castellanii* keine Unterschiede im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby Wildtyp beobachtet werden konnten. Nur die $\Delta fliA$ Mutante zeigte im Rahmen einer einfachen Infektionsrunde einen schwachen Invasionsdefekt.

Im Folgenden wurden erneut Infektionsassays in Amöben durchgeführt wobei nun jeweils ein Mutantenstamm mit dem Wildtypstamm innerhalb der Infektion um die vorhandenen Nahrungsressourcen konkurrierte. Dabei wurde beobachtet, ob einer der Stämme sich gegen den anderen durchsetzen und ihn innerhalb der Infektion verdrängen konnte. Um auch hier mögliche Effekte durch Akkumulation zu verstärken wurden wieder mehrere

Infektionszyklen über vier Wochen durchgeführt. Im Weiteren wurden die parallele Versuche mit *Lp* Corby und dem bereits gut untersuchten, sehr nah verwandten Stamm *Lp* Paris durchgeführt. Von beiden Stämmen standen für Infektionsversuche die orthologen Mutantenstämme $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$ und $\Delta fliA$ zur Verfügung. Für den Stamm *Lp* Corby wurden außerdem die $\Delta flaA$ und die $\Delta lpc2402$ Mutante verwendet.

In allen Versuchen konnten sich beide Wildtyp-Stämme klar in der Infektion behaupten. In keinem der verschiedenen Ansätze kam es zu einer Schwächung oder gar Verdrängung der Wildtypen. Sowohl *Lp* Corby als auch *Lp* Paris zeigen über vier vollständige Infektionszyklen hinweg eine gleich bleibend hohe Fähigkeit *Acanthamoeba* neu zu infizieren und innerhalb des Wirtes zu replizieren (Abb. 27). Die negativen Werte beim Nachweis einiger defizienter Bakterien sind dadurch zu erklären, dass die Bakterien-Amöben-Gemische vor dem Ausplattieren verdünnt wurden. Diese Verdünnungsstufe musste nach dem Bestimmen der CFU wieder mit einberechnet werden. Dadurch konnten auch Bakterienraten von unter 1 CFU/ml rechnerisch möglich sein und werden entsprechend dargestellt.

Die orthologen Mutanten $\Delta rpoN$ wurden innerhalb der Infektion in Konkurrenz zum jeweiligen Wildtyp aus dem System verdrängt. In der ersten Runde der Infektion zeigten beide $\Delta rpoN$ Mutanten keine oder nur eine schwach verminderte Replikationsrate. Von einem Infektionszyklus zum nächsten verstärkte sich dieser Effekt immer weiter bis nach der vierten Runde im Vergleich zum Wildtypen kaum noch Bakterien der Mutante nachzuweisen waren (Abb. 27A, E). Diese Verminderung war bei dem Versuch mit der $\Delta rpoN$ Mutante des Stammes *Lp* Paris noch sehr viel stärker zu beobachten als im *Lp* Corby. Nach 3 Infektionszyklen war der *rpoN*-defiziente Paris Stamm nahezu vollständig verdrängt (Abb. 27E).

Ein sehr ähnliches Bild boten die Infektionsversuche mit den $\Delta fleQ$ Mutanten in beiden Ansätzen. Hier war aber schon direkt zu Beginn der Versuche ein Verdrängen der Mutanten gegenüber den Wildtypen zu erkennen (Abb. 27B, F). Dieses verstärkte im Laufe der Infektionszyklen und führte in der $\Delta fleQ$ Mutante von *Lp* Paris bereits nach der 2. Runde dazu, dass dieser Stamm kaum noch nachzuweisen war, während der Wildtyp das normale Infektionsverhalten zeigte. Auch die *Lp* Corby $\Delta fleQ$ Mutante zeigte eine deutlich verminderte Replikation von Zyklus zu Zyklus, wurde allerdings nicht vollständig aus der Infektion verdrängt.

Bei Konkurrenzversuchen mit der $\Delta fliA$ Mutante zeigten sich Stamm-spezifische Unterschiede noch deutlicher. Während sich die $\Delta fliA$ Mutante aus *Lp* Corby relativ stabil innerhalb der Infektion halten konnte, kam es bei *Lp* Paris zum Verdrängen der $\Delta fliA$ Mutante nach 3 Infektionszyklen (Abb. 27C, G). Die $\Delta fliA$ Mutante im Corby Stamm zeigte im Vergleich zum Wildtyp jede Runde ein leicht verzögertes Replikationsverhalten, konnte dieses aber von Tag 4 bis 7 wieder kompensieren, sodass an Tag 7 beim erneuten Infektionsstart beide Stämme wieder vergleichbar waren. Da dieses Zeitfenster nicht näher untersucht wurde, konnten keine definitiven Aussagen darüber getroffen werden.

Da die Rolle von *fliA* im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet werden sollte, wurden für weitere konkurrierende Infektionsversuche Mutanten der FliA-Effektorproteine FlaA und LPC2402 verwendet. Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression des *flaA* Gens direkt mit der *fliA* Expression zusammenhängt (Heuner et al. 1997; Heuner et al. 2002). Im Weiteren wurde nach Microarray-Analysen eine Verbindung zwischen FliA und der Expression von *lpp0952* (entspricht *lpc2402*) gefunden (Brüggemann et al. 2006; Albert-Weissenberger et al. 2010).

Eine Koinfektion von *A. castellanii* mit *Lp* Corby Wildtyp und der $\Delta lpc2402$ Mutante zeigte nach vier Infektionszyklen keinen deutlichen Effekt. Beide Stämme konnten innerhalb des Wirtes nebeneinander existieren und replizieren (Abb. 27H). Das Deletieren von *lpc2402* sorgte in diesem Infektionsversuch für keine Veränderung des Phänotyps. Es konnten keine Ähnlichkeiten zu dem Infektionsverhalten der $\Delta fliA$ Mutante beobachtet werden. Eine Infektion mit diesem Stamm kann in gewissem Maße als Kontrolle dieses Versuchsaufbaus angesehen werden, da es zu keiner oder nur einer geringen Veränderung über die Zeit kommt. Als Kontrolle kann natürlich auch der jeweilige Wildtyp dienen. Auch hier kommt es über die Zeit zu keiner künstlichen Erhöhung oder Verringerung der CFU.

Eine Deletion des Flagellin-Gens *flaA* führte in Konkurrenz zum Wildtyp während einer Infektion zu keinem Verdrängen der Mutante, aber auch zu einer verzögerten Replikation, ähnlich wie bei der *Lp* Corby $\Delta fliA$ Mutante (Abb. 27D). Der Effekt war sogar in der $\Delta flaA$ Mutante etwas stärker zu beobachten.

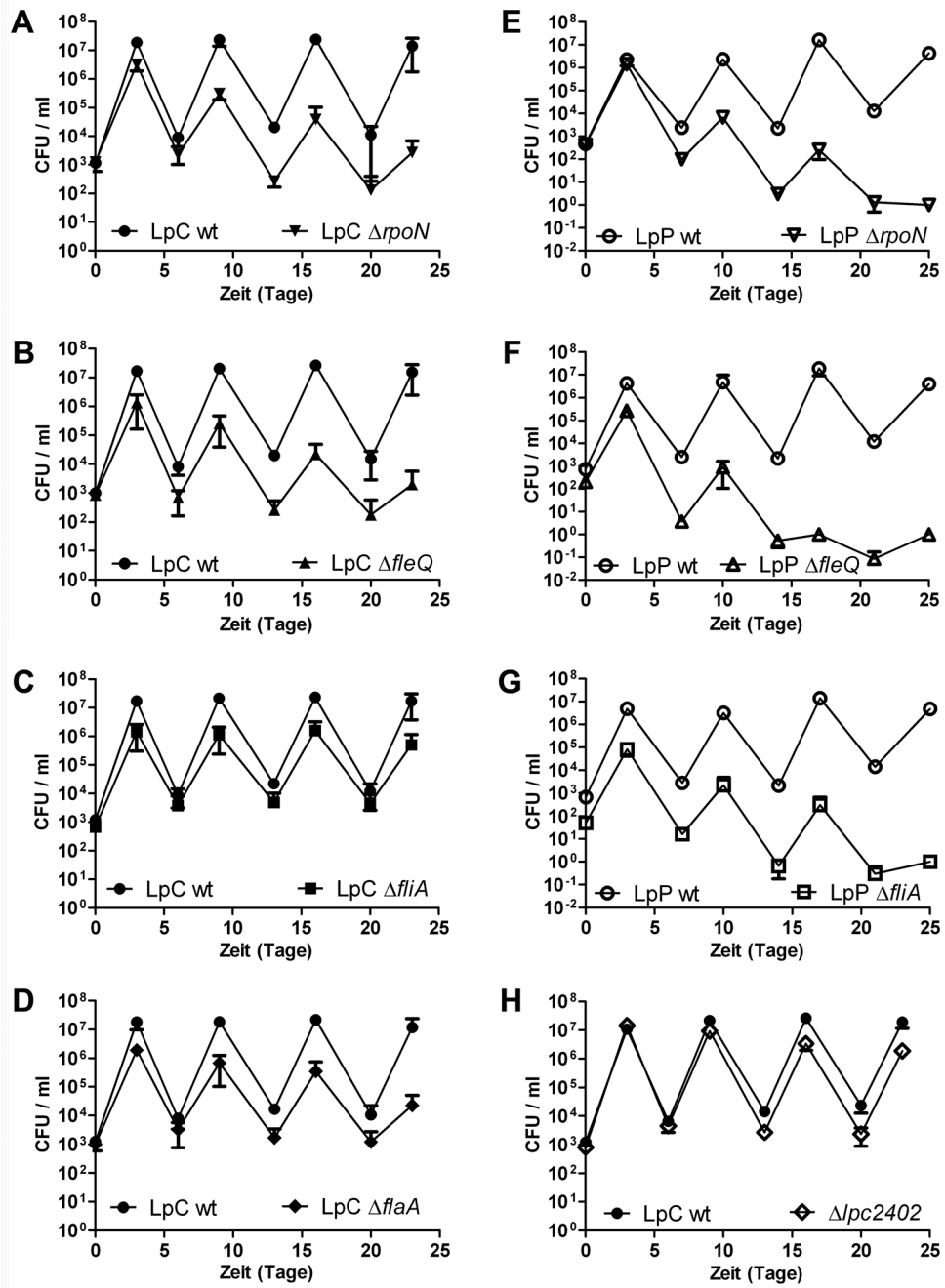


Abb. 27: Untersuchung der *L. pneumophila* Stämme Corby (LpC) und Paris (LpP) und orthologer Mutanten Stämme in Konkurrenz zueinander im Infektionsmodell *A. castellanii* mit Reinfektion über 4 Wochen. Axenisch gewachsene Amöben wurden jeweils mit einer Mischung aus Bakterien eines Wildtypstammes und denen eines Mutantenstammes und einer MOI von 0,01 koinfiziert, nach 2 h gewaschen und für drei Tage bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der kolonie-bildenden Einheiten (CFU) wurden das Inokulum und die resuspendierten Bakterien nach drei Tagen auf BCYE Agarplatten mit und ohne Kanamycin ausplattiert und für drei Tage bei 37°C inkubiert. Mittels Antibiotikum konnte zwischen Wildtypstamm und Mutante unterschieden werden. Zur Bestimmung der Anzahl der wildtypischen Bakterien wurden die CFU der BCYE Platten mit Kanamycin von denen ohne Kanamycin subtrahiert. Die resuspendierten Bakterien wurden für weitere vier Tage bei 37°C inkubiert und anschließend 1:1.000 verdünnt um frische Amöben erneut zu infizieren. Dieser Zyklus wurde viermal wiederholt. Gezeigt werden die Mittelwerte mit +/- Standardabweichung von Doppelansätzen und drei unabhängigen Experimenten. Symbole: schwarzer Kreis (●), *L. pneumophila* Corby Wildtyp; nach unten zeigendes schwarzes Dreieck (▼), LpC *ΔrpoN* Mutante; nach oben zeigendes schwarzes Dreieck (▲), LpC *ΔfleQ* Mutante; schwarzes Viereck (■), LpC *ΔfliA* Mutante; schwarze Raute (◆), LpC *ΔflaA* Mutante; weiße Raute (◇), LpC *Δlpc2402* Mutante; weißer Kreis (○), *L. pneumophila* Paris Wildtyp; nach unten zeigendes weißes Dreieck (▽), LpP *ΔrpoN* Mutante; nach oben zeigendes weißes Dreieck (△), LpP *ΔfleQ* Mutante; weißes Viereck (□), LpP *ΔfliA* Mutante.

4.3 Das Flagellen-Regulon - Transkriptionelle und translationelle Untersuchungen von *Lp Corby*

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das σ^{54} -Aktivatorprotein FleQ der Hauptregulator (*master regulator*) der Expression der Flagellengene in *L. pneumophila* ist (Jacobi et al. 2004; Albert-Weissenberger et al. 2010). Außerdem wurde in verschiedenen Arbeiten bereits nachgewiesen, dass der alternative σ^{28} Faktor FliA der wichtigste positive Regulator des Flagellengens (*flaA*) ist (Heuner et al. 1997; Heuner et al. 1999; Heuner et al. 2002; Albert-Weissenberger et al. 2010). Es gibt aber auch widersprüchliche Beobachtungen über den Einfluss von FleQ auf die *fliA* Expression in verschiedenen *L. pneumophila* Stämmen. Im Stamm *Lp Paris* wird die Expression von *fliA* positiv von FleQ beeinflusst, während in *Lp Corby* die *fliA* Expression von FleQ nahezu unbeeinflusst zu sein scheint (Jacobi et al. 2004; Albert-Weissenberger et al. 2010).

Zur Bewertung der unterschiedlichen Daten für *Lp Corby* und *Paris* und zur weiteren Bestimmung der Abläufe der Flagellenregulationskaskade wurden in diesem Abschnitt der Arbeit transkriptionelle und translationelle Veränderungen während des Lebenszyklus von *L. pneumophila* *Corby* untersucht. Dazu wurden wie bereits beschrieben über die Zeit hinweg zu definierten Zeitpunkten während des Wachstums in YEB-Medium Proben genommen (Abb. 24), aufbereitet und mittels Reverse Transkriptase (RT-) PCR und Western Blot näher untersucht. Die Zeitpunkte werden im Weiteren wie folgt abgekürzt: E, exponentielle Phase (*exponential phase*); LE, spät exponentielle Phase (*late exponential phase*); PE, postexponentielle Phase (*postexponential phase*) und S, stationäre Phase (*stationary phase*). Neben dem Wildtyp *Lp Corby* wurden mit den Mutanten $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta fliA$, $\Delta flaA$ und $\Delta flaR$ die wichtigsten regulatorischen Bestandteile der Flagellenkaskade untersucht. Die Expression folgender Gene wurde näher betrachtet - *rpoN*, *fleQ*, *fliA*, *flaA* und *fleR*. Durch unterschiedliche Zyklusanzahlen wurde die Transkription semiquantitativ untersucht. Für alle RNA-Proben wurde die (RT-) PCR jeweils mit 24, 27 und 30 Zyklen durchgeführt. Die Abb. 28A zeigt für jedes Gen ein ausgewähltes Ergebnis mit bestimmter Zyklenanzahl. So werden für das Gen *flaA* die Ergebnisse mit 24 Zyklen gezeigt und für die Gene *rpoN*, *fleQ*, *fliA* und *fleR* die Resultate mit 27 Zyklen. Eine Gesamtübersicht der (RT-) Ergebnisse mit allen Zyklen ist im Anhang zu finden. Weiterhin wurde das Vorkommen der Proteine FleQ, FliA und FlaA im Verlaufe des Lebenszyklus von *Legionella* untersucht. Das *major outer membrane protein* Momp diente als Ladekontrolle.

Die Daten der Transkription und der Translation der untersuchten Gene und Proteine zeigten insgesamt eine gute Übereinstimmung. Die durch die RT-PCR bestimmten Transkriptionsraten der jeweiligen Gene spiegelten sich in den durch Western Blot Analysen ermittelten Proteinmengen und somit den Translationshäufigkeiten wider (Abb. 28). In den nächsten Abschnitten soll auf einzelne Gene, Proteine und deren Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutantenstämmen näher eingegangen werden.

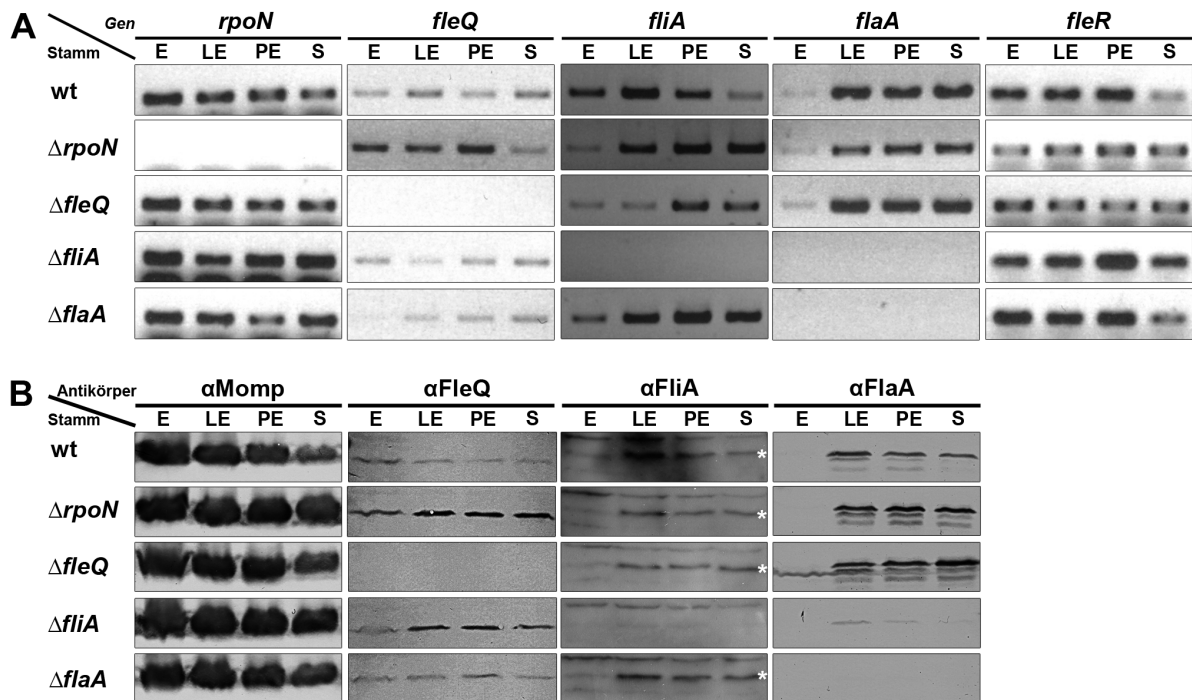


Abb. 28: Reverse Transkriptase (RT-) PCR und Western Blot Untersuchungen verschiedener Gene und Proteine von *L. pneumophila* Corby und Mutantenstämmen. (A, B) Aus Flüssigkulturen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und den entsprechenden Wachstumsumsphasen Proben entnommen und für die RT-PCR und Western Blot Analysen vorbereitet. (A) Für RT-PCR Versuche wurde Gesamt-Zell RNA isoliert und anschließend gleiche Mengen (10 ng) für die Amplifikation genutzt. Für das Gen *flaA* wurden 24 Zyklen benötigt und für die Gene *rpoN*, *fleQ*, *fliA* und *fleR* 27 Zyklen. Ein 2 % Agarose Gel wurde zur Analyse nach der PCR mit gleichen Mengen beladen. (B) Für die Western Blot Untersuchungen wurden gleiche Mengen (30 µg) von Gesamt-Zell Lysaten mit Hilfe von 12 % Polyacrylamid Gelen aufgetrennt. Nach dem Blotten auf Nitrozellulose Membranen wurden mit Antikörpern gegen FleQ, FliA und FlaA die spezifischen Epitope nachgewiesen. Das Protein der äußeren Membran Momp diente als Ladekontrolle. Die Ergebnisse wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. Abkürzungen: E, exponentielle Wachstumsphase; LE, spät exponentielle Wachstumsphase; PE, post exponentielle Wachstumsphase; S, stationäre Wachstumsphase.

4.3.1 Expression von *rpoN*

RpoN als alternativer σ^{54} Faktor sorgt zusammen mit FleQ für die Aktivierung der frühen Gene des Flagellenregulons. Das Gen *rpoN* von *Lp* Corby wurde in allen Wachstumsphasen nahezu konstitutiv exprimiert was mit veröffentlichten Beobachtungen im Stamm *Lp* Paris gut übereinstimmt (Brüggemann et al. 2006; Albert-Weissenberger et al. 2010). Das Gen konnte als Haushaltsgen somit gut zur Überprüfung der eingesetzten RNA-Menge dienen. Die Transkription von *rpoN* wurde in den Mutanten $\Delta fleQ$ und $\Delta flaA$ nicht signifikant beeinflusst. Das Gen war in der Mutante $\Delta fliA$ leicht induziert (Abb. 28A, *rpoN*).

4.3.2 Expression von *fleQ* und Vorkommen von FleQ

FleQ ist ein σ^{54} -Aktivatorprotein und der Hauptregulator (*master regulator*) der Expression der Flagellengene. Im Wildtyp stieg die Transkriptionsrate des *fleQ* Gens von der E zur LE Phase an und verminderte sich von der LE zur PE Phase (Abb. 28A; *fleQ*/wt). Die höchste Menge an FleQ Protein wurde in der E Phase detektiert, während eine geringe aber konstante Menge von der LE zur S Phase gefunden werden konnte (Abb. 28B; $\alpha FleQ$ /wt). In der $\Delta rpoN$ Mutante war die Expression von *fleQ*, besonders in der PE Phase hochreguliert (Abb. 28A; *fleQ*/ $\Delta rpoN$). Dies konnte auf Ebene der Proteine durch höhere Mengen an FleQ in der $\Delta rpoN$ Mutante im Vergleich zum Wildtypen ebenfalls gezeigt werden (Abb. 28B; $\alpha FleQ$ / $\Delta rpoN$). In der $\Delta fliA$ und der $\Delta flaA$ Mutante war die Transkription von *fleQ* nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 28A; *fleQ*/ $\Delta fliA$, *fleQ*/ $\Delta flaA$). Allerdings wurde für die $\Delta fliA$ Mutante zwischen der LE und PE Phase eine größere Menge von FleQ-Protein nachgewiesen, während die $\Delta flaA$ Mutante ähnliche Proteinmengen wie der Wildtyp zeigte (Abb. 28B; $\alpha FleQ$ / $\Delta fliA$, $\alpha FleQ$ / $\Delta flaA$).

4.3.3 Expression des alternativen σ^{28} Faktors *fliA* und Vorkommen von FliA

Der alternative σ^{28} Faktor FliA sorgt für die Expression des Flagellinsgens *fliA*. Die Expressionsrate des *fliA* Gens im Wildtyp stieg von der E zur LE Phase und verminderte sich anschließend bis zur PE Phase (Abb. 28A; *fliA*/wt). Ein ähnliches Muster konnte für die FliA-Proteinmenge gezeigt werden (Abb. 28B; $\alpha FliA$ /wt). Die $\Delta rpoN$ Mutante zeigte sowohl beim *fliA* Gen als auch beim FliA Protein im Vergleich zum Wildtypstamm eine verminderte Expression in der E Phase, aber eine Expressionssteigerung von der PE zur S Phase (Abb.

28A; *fliA*/ Δ *rpoN*; Abb. 28B; α FliA/ Δ *rpoN*). In der Δ *fleQ* Mutante war die *fliA* Expression in der LE Phase geringer als im Wildtyp, allerdings verminderte sich die Expression im Weiteren nicht wie im Wildtyp (Abb. 28A; *fliA*/ Δ *fleQ*). Dieses Expressionsverhalten konnte mittels Western Blot Analyse bestätigt werden (Abb. 28B; α FliA/ Δ *fleQ*). Interessanterweise war in der Δ *flaA* Mutante von der LE zur S Phase die Transkription und die Menge an FliA Protein hochreguliert (Abb. 28A; *fliA*/ Δ *flaA*; Abb. 28B; α FliA/ Δ *flaA*). Auf den Transkriptionsstart von *fliA* und die Lokalisation innerhalb eines Operons wird in einem späteren Abschnitt näher eingegangen (Kapitel 4.3.6).

4.3.4 Expression von *flaA* und Vorkommen von Flagellin (FlaA)

Das Flagellin (FlaA) als Hauptbestandteil des Filaments wurde in den Zellen in großen Mengen gefunden. Auch die Detektion der mRNA des Flagellins (*flaA*) konnte mit der RT-PCR bereits mit 24 Zyklen durchgeführt werden. Im Wildtyp stieg die Transkription des *flaA* Gens in der LE Phase an und blieb bis zur S Phase auf hohem Niveau (Abb. 28A; *flaA*/wt). Das Flagellin wurde ab der LE Phase bis zur S Phase detektiert (Abb. 28B; α FlaA/wt). Die *flaA* Transkription und die Menge des detektierten FlaA war in der Δ *fleQ* Mutante im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 28A; *flaA*/ Δ *fleQ*; Abb. 28B; α FlaA/ Δ *fleQ*). Die Δ *rpoN* Mutante zeigte ebenfalls eine höhere FlaA-Proteinmenge (Abb. 28B; α FlaA/ Δ *rpoN*). Die Ergebnisse für die Δ *rpoN* und die Δ *fleQ* Mutante stehen im Gegensatz zu einer früheren Studie. Dort wurde für den Stamm *Lp* Paris eine Reduktion des Flagellins in der postexponentiellen Phase beschrieben (Albert-Weissenberger et al. 2010). Wie bereits zuvor veröffentlicht, konnte in der Δ *fliA* Mutante das *flaA*-Transkript nicht und das FlaA-Protein nur in sehr geringem Maße nachgewiesen werden (Abb. 28A; *flaA*/ Δ *fliA*; Abb. 28B; α FlaA/ Δ *fliA*) (Heuner et al. 2002).

4.3.5 Expression von *fleR*

FleR ist Bestandteil des 2-Komponentensystems FleS/FleR und gehört zu den Klasse II Genen der Flagellenkaskade. Das Gen *fleR* zeigte im Wildtyp eine hohe Expression in den Phasen E bis PE mit einer Abschwächung in der S Phase (Abb. 28A; *fleR*/wt). Die Expression war sowohl in der Δ *rpoN* als auch in der Δ *fleQ* Mutante über alle Phasen hinweg etwas schwächer (Abb. 28A; *fleR*/ Δ *rpoN*, Δ *fleQ*). Ein ähnliches Bild konnte bereits für den Stamm

Lp Paris gezeigt werden (Albert-Weissenberger et al. 2010). Die $\Delta fliA$ Mutante zeigte in den frühen Phasen E und LE ein ähnliches Expressionsverhalten wie der Wildtyp, aber eine höhere Expression in den Phasen PE und S (Abb. 28A; *fleR*/ $\Delta fliA$). Die Expression in der $\Delta fliA$ Mutante war dem Wildtyp ähnlich (Abb. 28A; *fleR*/ $\Delta fliA$).

4.3.6 Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von *flhF*, *fleN* und *fliA*

Obwohl FliA der Hauptregulator von FlaA ist, war bisher kaum etwas über die Regulation von FliA bekannt. Zum Teil wurden widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. So wurde für die *fliA* Expression in *Lp* Corby eine Unabhängigkeit von dem *master regulator* FleQ beschrieben, während in *Lp* Paris *fliA* direkt abhängig von FleQ exprimiert wird (Jacobi et al. 2004; Albert-Weissenberger et al. 2010). Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich zu den wachstumsabhängigen Untersuchungen der Expression des *fliA* Gens und des FliA Proteins die Organisation des *fliA* Operons und der Transkriptionsstart von *fliA* bestimmt. Das Gen *fliA* befindet sich in einem Verbund von Genen, welche alle dem Flagellen-Regulon angehören. Insgesamt 13 dieser Gene von *fliM* bis *motB* liegen in gleicher Orientierung hintereinander im Genom vor (Abb. 49). Aus diesem Grund ist eine Regulation als gesamtes Operon möglich. Vorhergehende Microarray-Studien lassen vermuten, dass innerhalb dieses Operons mehrere Transkriptionsstartpunkte zu finden sind. Diese könnten jeweils vor den Genen *flhF*, *fleN* und *fliA* liegen (Albert-Weissenberger 2008). Deshalb wurde nur ein Teil des Operons, *flhA* bis *motB*, im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet. In diesem Bereich liegen die Gene *flhA*, *flhF*, *fleN*, *fliA*, *motA* und *motB* hintereinander (Abb. 29A).

Zur Bestimmung der Operon-Struktur wurde der *L. pneumophila* Corby Wildtyp wie zuvor beschrieben in YEB-Medium angezogen, zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen und jeweils die Gesamt-RNA isoliert und gereinigt (Abb. 24). Mit Hilfe von Reverse Transkriptase (RT-) PCR wurde die Expression der Gene untersucht. Zusätzlich zu den genspezifischen Primern wurden Primer verwendet, welche jeweils den Bereich von der Mitte des einen Gens bis zur Mitte des *downstream* folgenden Gens und somit den intergenischen Bereich zwischen den Genen amplifizieren. Dadurch sollten Aussagen über eine mögliche gemeinsame mRNA dieser beiden Gene getroffen werden. Die Bindungsstellen der verschiedenen Primern sind schematisch in Abb. 29A gezeigt. Zunächst wurden alle entsprechenden Primerpaare und die entstehenden Produkte anhand von genomischer DNA von *Lp* Corby überprüft (Abb. 29B).

Für die RT-PCR wurden 10 ng RNA und 27 Zyklen eingesetzt und die Produkte mit Hilfe eines 2 %igen Agarosegels aufgetrennt (Abb. 29C). Die Ergebnisse zeigten für die Gene *flhA*, *flhF* und deren intergenischem Bereich in allen Phasen eine sehr geringe Expression (Abb. 29C; *flhA*, *flhF*, ig1-ig2). Der intergenische Bereich zwischen *flhF* und *fleN* zeigte ebenfalls eine sehr geringe Expression (Abb. 29C; ig3-ig4). Wahrscheinlich wird die Expression beider Gene unterschiedlich reguliert. Die Gene *fleN* und *fliA* zeigten beide einen Anstieg der Expression in der spät exponentiellen Phase und schwächer werdende Signale in den folgenden Wachstumsphasen (Abb. 29C; *fleN*, *fliA*). Für beide Gene wurde in den verschiedenen Wachstumsphasen ein ähnliches Expressionsmuster gefunden. Die Untersuchungen der intergenischen Bereiche zeigten aber nur eine sehr schwache Expression (Abb. 29C; ig5-ig6). Anhand dessen lassen sich jeweils eigene Transkriptionsstartpunkte für diese Gene vermuten. Die Gene *motA* und *motB* zeigten bereits in der exponentiellen Phase bis zur spät exponentiellen Phase eine relative starke Expression und abnehmende Expressionsraten in den folgenden Phasen (Abb. 29C; *motA*, *motB*). Der intergenische Bereich zwischen *fliA* und *motA* zeigte ein ähnliches, aber schwächeres Expressionsmuster (Abb. 29C; ig7-ig8). Möglicherweise werden beide Gene gemeinsam exprimiert. Interessanterweise konnte für den Bereich zwischen *motA* und *motB* kein Produkt gezeigt werden (Abb. 29C; ig9-ig10). Obwohl beide Gene direkt ineinander übergehen und beide als Klasse III Gene des Flagellenregulons eine gemeinsame Funktion (Motilität) erfüllen, werden sie vermutlich nicht als eine gemeinsame mRNA exprimiert.

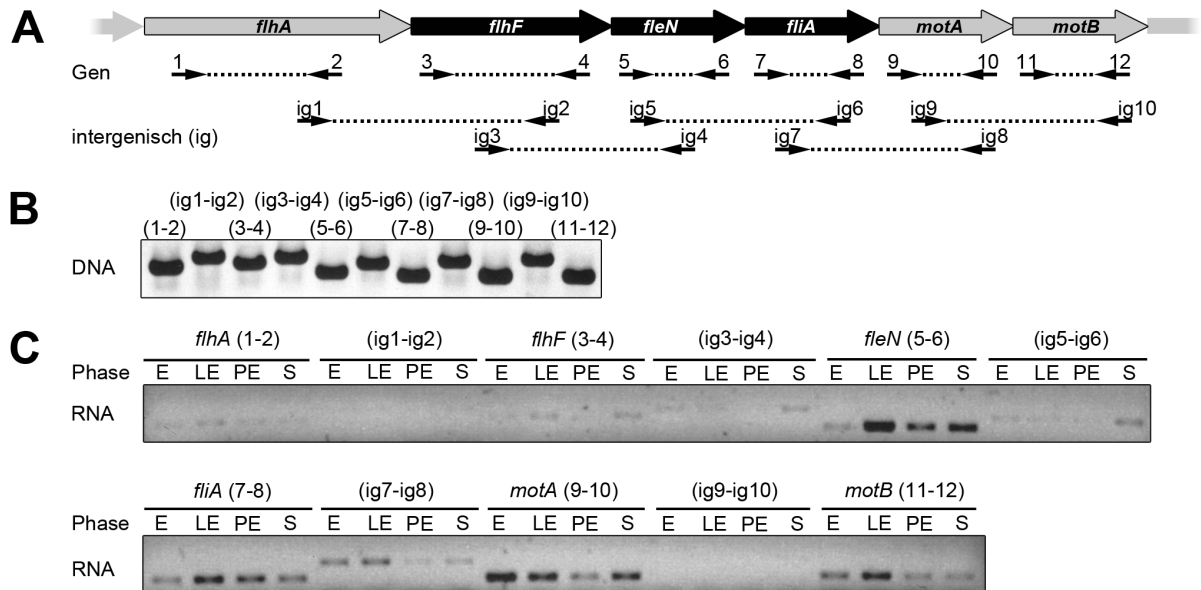


Abb. 29: Bestimmung der Operon-Struktur von *fliA* und den umliegenden Genen mit Hilfe von Reverse Transkriptase (RT-) PCR. (A) Strukturelle Übersicht eines Ausschnitts des *fliM*-Operons mit der Sequenz zwischen *flhA* und *motB*. Die Gene, deren Transkriptionsstartpunkte mittels 5'RACE Experimenten näher bestimmt werden sollten sind als schwarze Pfeile dargestellt (*flhF*, *fleN* und *fliA*). *Upstream* und *downstream* dieses Ausschnittes befinden weitere Gene, welche nur teilweise dargestellt wurden. Die Länge der Pfeile entspricht in etwa den relativen Größenverhältnissen der Gene. Zur Überprüfung der Operon-Struktur wurden eine (B) PCR mit genomischer DNA zur Kontrolle der Primer und eine (C) RT-PCR mit den dargestellten Primern durchgeführt. Mit Hilfe dieser Primerpaare wurden sowohl die Gene selbst als auch die intergenischen Bereiche amplifiziert. Für die RT-PCR wurde Gesamt-RNA in unterschiedlichen Wachstumsphasen isoliert und gereinigt. 10 ng RNA wurden für die RT-PCR mit 27 Zyklen analysiert und die Produkte mit einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Ergebnisse wurden in mindestens 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Abkürzungen: ig, intergenisch; E, exponentielle Wachstumsphase; LE, spät exponentielle Wachstumsphase; PE, post exponentielle Wachstumsphase; S, stationäre Wachstumsphase.

Für die genaue Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der Gene *flhF*, *fleN* und *fliA* wurden 5'RACE Experimente durchgeführt, bei denen zunächst RNA aus der spät exponentiellen Phase von *Lp* Corby und verschiedenen Mutantenstämmen isoliert wurde. Mittels Reverser Transkriptase PCR und genspezifischen Primern wurde zunächst das 5'Ende der mRNA, also die Promotorregion, in cDNA umgeschrieben. Nach der Reinigung der cDNA wurde durch eine anschließende PCR ein Poly-A-Schwanz an das 3'Ende der cDNA angehängt. Zusätzlich zu der isolierten RNA wurden allen Reaktionsansätzen auch Kontroll-RNAs beigelegt. Dadurch konnte mittels Kontroll-PCR und spezifischen Primern eine erfolgreiche Durchführung des Versuchs überprüft und eine Degradation der RNA

ausgeschlossen werden (Abb. 30, Abb. 32, Abb. 33; Spur: K1, K2, K3). Das Produkt der RACE-PCR (Abb. 30, Abb. 33; Spur: R) wurde anschließend sequenziert und ausgewertet. Bei einem sehr schwachen Ergebnis der RACE-PCR wurde eine weitere PCR mit Primern innerhalb des RACE-PCR-Produkts durchgeführt (Abb. 32, Spur: R1, R2).

Die Bestimmung des Transkriptionsstartes von *flhF* wurde in dem Stamm *Lp* Corby Wildtyp und in den Mutanten $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ desselben Stammes durchgeführt. Die Kontroll-PCRs bei der Analyse beider Stämme zeigten das zu erwartende Bandenmuster (Abb. 30, Spur: K1, K2, K3). Zusätzlich wurde in der Kontrolle nach der cDNA Synthese in allen drei Stämmen eine Bande von etwa 500 bp (Abb. 30, Spur: K1) nachgewiesen. Da sich in dem Reaktionsansatz sowohl Kontroll-RNA als auch die selbst isolierte RNA und die entsprechenden Primer befanden, handelt es sich wahrscheinlich bei dieser Bande um die cDNA von *flhF*. In den weiteren Kontrollansätzen wurden PCRs durchgeführt, welche spezifische Primer zur Kontrolle benutzten, weshalb in diesen Spuren eine *flhF*-Bande nicht mehr zu detektieren war. Das Produkt der RACE-PCR bildete in allen drei Stämmen eine Bande bei etwa 500 bp (Abb. 30, wt und $\Delta fleQ$; Spur: R). Allerdings konnte in der $\Delta rpoN$ Mutante nur eine sehr schwache Bande nachgewiesen werden.

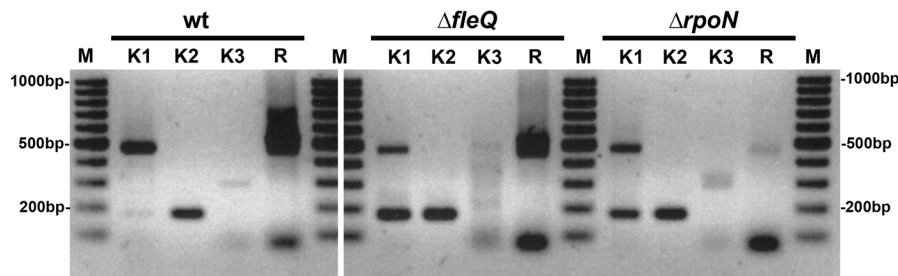
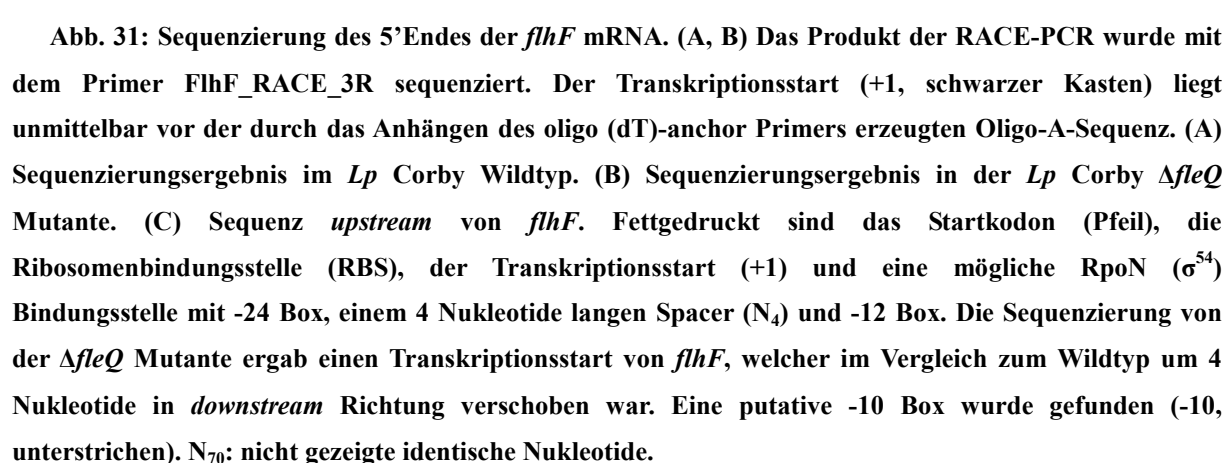


Abb. 30: Überprüfung der RACE-Reaktionen und Amplifikation der cDNA von *flhF*. Untersucht wurde die Promotorregion von *flhF* in den Stämmen *Lp* Corby Wildtyp (wt), *LpC* $\Delta fleQ$ Mutante ($\Delta fleQ$) und *LpC* $\Delta rpoN$ Mutante ($\Delta rpoN$). Es wurden Kontroll-PCRs zur Überprüfung der cDNA Synthese (K1; Primer: neo3/for und neo2/rev; Produkt: 157 bp), der Aufreinigung der cDNA (K2; Primer: neo3/for und neo2/rev; Produkt: 157 bp) und das Anfügen des Poly-A-Schwanzes (K3; Primer: neo2/rev und oligo (dT)-anchor; Produkt: 293 bp) durchgeführt. Die Amplifikation des 5'Endes der *flhF* cDNA wurde mit den Primern oligo (dT)-anchor und FlhF_RACE_2R durchgeführt (R) und das Produkt von etwa 500 bp anschließend sequenziert. Größenstandard: M, 100 bp DNA-Marker.

Mit dem Primer FlhF_RACE_3R konnten RACE-PCR-Produkte *upstream* der Primerbindungsstelle über das Startkodon bis zum Transkriptionsstart sequenziert werden (Abb. 31A, B). Davor lag die Poly-A-Sequenz, welche während des Versuches angehängt wurde. Das letzte Nukleotid, welches sich vor dieser Sequenz befindet, entspricht dem Transkriptionsstart von *flhF*. Durch die Bestimmung des Startpunktes konnten mögliche Bindungsstellen für σ -Faktoren gefunden werden. Der Vergleich mit der Genomregion von *flhF* ergab unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte für *flhF* im Wildtyp und in der $\Delta fleQ$ Mutante. Im Wildtyp konnte eine mögliche RpoN (σ^{54}) Bindungsstelle mit -24 Box, einem 5 Nukleotide langen Spacer (N₅) und eine -12 Box gefunden werden. Die Sequenz dieses RpoN-abhängigen Promotors lautet TGGCAC-N₅-GTGC. In der $\Delta fleQ$ Mutante wurde ein um 4 Basen *downstream* verschobener Transkriptionsstartpunkt gefunden. Durch diese Verschiebung konnte eine neue putative -10 Box lokalisiert werden (Abb. 31C). In der $\Delta rpoN$ Mutante konnte ein Transkriptionsstartpunkt nicht bestimmt werden. Vermutlich war die *flhF* mRNA nicht vorhanden oder die Menge als Ausgangspunkt für die RACE Analyse zu gering. Da für den Wildtyp ein RpoN-abhängiger Transkriptionsstartpunkt gefunden wurde, ist dieses Ergebnis eine Bestätigung der identifizierten σ^{54} Bindungsstelle.



130

$\Delta fleQ$, Spur: R1; $\Delta rpoN$, Spur: R1). In allen 3 Ansätzen wurde eine weitere PCR zur Erhöhung der Produktmenge der RACE-PCR durchgeführt. Dieses führte in allen Ansätzen zu einem deutlichen Ergebnis (Abb. 32 wt, Spur: R2; $\Delta fleQ$, Spur: R2; $\Delta rpoN$, Spur: R2). Diese Produkte wurden gereinigt und sequenziert. In jedem der sequenzierten Produkte konnte die genomische Sequenz vor dem Start von *fleN* gefunden werden. Jedoch konnte eine Poly-A-Sequenz in keinem der Produkte detektiert werden (nicht gezeigt). Die Sequenzierung erfolgte jeweils bis etwa 500 bp *upstream* des Startkodons von *fleN*, bis weit in das dort liegende Gen *flhF* hinein. Eine Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes war dadurch nicht möglich. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Startpunkt noch weiter *upstream* liegt. Eine Ko-Transkription der Gene *flhF* und *fleN* konnte allerdings durch Untersuchungen der Operon-Struktur ausgeschlossen werden (Abb. 29C). Möglicherweise können weitere RT-PCR Versuche mit Primerpaaren, die weniger große Bereiche amplifizieren, genauere Aussagen zur Expression von *fleN* liefern.

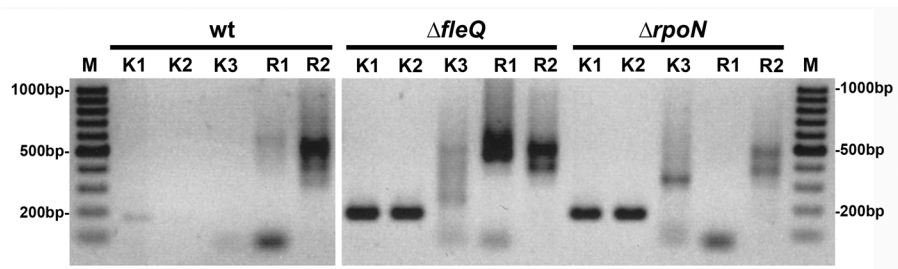


Abb. 32: Überprüfung der RACE-Reaktionen und Amplifikation der cDNA von *fleN*. Untersucht wurde die Promotorregion von *fleN* in den Stämmen *Lp* Corby Wildtyp (wt), *LpC* $\Delta fleQ$ Mutante ($\Delta fleQ$) und *LpC* $\Delta rpoN$ Mutante ($\Delta rpoN$). Es wurden Kontroll-PCRs zur Überprüfung der cDNA Synthese (K1; Primer: neo3/for und neo2/rev; Produkt: 157 bp), der Aufreinigung der cDNA (K2; Primer: neo3/for und neo2/rev; Produkt: 157 bp) und das Anfügen des Poly-A-Schwanzes (K3; Primer: neo2/rev und oligo (dT)-anchor; Produkt: 293 bp) durchgeführt. Die Amplifikation des 5'Endes der *fleN* cDNA wurde mit den Primern oligo (dT)-anchor und FleN_RACE_2R durchgeführt (R1). Das erhaltene Produkt wurde aufgrund der geringen Menge mit den Primern oligo (dT)-anchor und FleN_RACE_3R erneut amplifiziert (R2) und das Produkt von etwa 500 bp anschließend sequenziert. Größenstandard: M, 100 bp DNA-Marker.

Der Transkriptionsstart des alternativen σ^{28} Faktors FliA war trotz seiner wichtigen Funktion in der Regulation der Flagellenkaskade bisher unbekannt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auch dieser Startpunkt näher untersucht. Dazu wurde die RNA der Stämme *Lp*

Corby Wildtyp, die $\Delta fleQ$ und die $\Delta rpoN$ Mutante ebenfalls mittels der 5'RACE Methode analysiert. Hierbei zeigten die ersten beiden Kontroll-PCRs in allen Ansätzen ein erfolgreiches Ergebnis mit deutlichen Banden (Abb. 33 wt, Spur: K1, K2; $\Delta fleQ$, Spur: K1, K2; $\Delta rpoN$, Spur: K1, K2). Zusätzlich konnte man ähnlich wie bei dem RACE Versuch mit *flhF* die cDNA von *fliA* bereits nach der Synthese mit einer Größe von etwa 550 bp erkennen (Abb. 33 wt, Spur: K1; $\Delta fleQ$, Spur: K1; $\Delta rpoN$, Spur: K1). Die dritte Kontroll-PCR war in der Wildtyp-Probe am deutlichsten zu erkennen, während in den Mutanten eher eine schwache Bande zu sehen war (Abb. 33 wt, Spur: K3; $\Delta fleQ$, Spur: K3; $\Delta rpoN$, Spur: K3). Die RACE-PCR für FliA führte zu sehr deutlichen Banden mit einer Größe von etwa 550 bp (Abb. 33 wt, Spur: R; $\Delta fleQ$, Spur: R; $\Delta rpoN$, Spur: R). Diese Produkte wurden im nächsten Schritt sequenziert und ausgewertet.

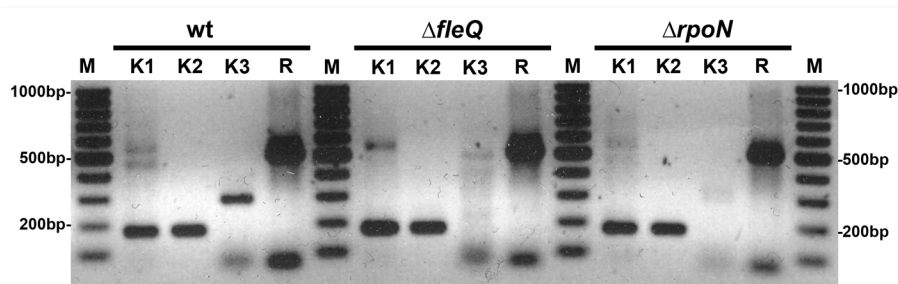


Abb. 33: Überprüfung der RACE-Reaktionen und Amplifikation der cDNA von *fliA*. Untersucht wurde die Promotorregion von *fliA* in den Stämmen *Lp* Corby Wildtyp (wt), *LpC* $\Delta fleQ$ Mutante ($\Delta fleQ$) und *LpC* $\Delta rpoN$ Mutante ($\Delta rpoN$). Es wurden Kontroll-PCRs zur Überprüfung der cDNA Synthese (K1; Primer: neo3/for und neo2/rev; Produkt: 157 bp), der Aufreinigung der cDNA (K2; Primer: neo3/for und neo2/rev; Produkt: 157 bp) und das Anfügen des Poly-A-Schwanzes (K3; Primer: neo2/rev und oligo (dT)-anchor; Produkt: 293 bp) durchgeführt. Die Amplifikation des 5'Endes der *fliA* cDNA wurde mit den Primern oligo (dT)-anchor und FliA_RACE_2R durchgeführt (R) und das Produkt von etwa 550 bp anschließend sequenziert. Größenstandard: M, 100 bp DNA-Marker

Die Auswertung der Sequenzierungen konnte in allen Ansätzen die Poly-A-Sequenz, welche während des Versuches vor den Transkriptionsstart angehängt wurde, nachweisen. Das letzte sequenzierte Nukleotid entspricht diesem Start und ist in den Stämmen *Lp* Corby Wildtyp, $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ Mutante dieselbe Base (Abb. 34A, B, C). Vor diesem Startpunkt konnte in der genomischen Sequenz eine mögliche Bindungsstelle für einen Sigmafaktor mit -35 Box, einem 16 Nukleotide langen Spacer (N_{16}) und -10 Box identifiziert werden (Abb. 34D). Allerdings könnten an dieser Stelle aufgrund der Ähnlichkeiten der Konsensussequenzen die beiden Sigmafaktoren RpoD (σ^{70}) und RpoS (σ^S) binden.

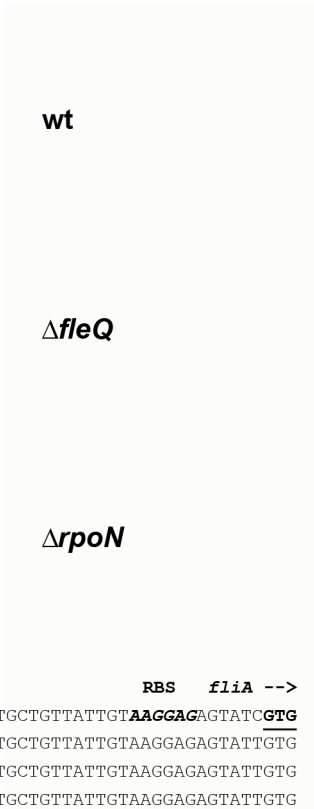


Abb. 34: Ergebnis der Sequenzierung des 5'Endes der *fliA* mRNA. (A, B, C) Es wurde das Produkt der RACE-PCR mit dem Primer FliA_RACE_3R sequenziert. Der Transkriptionsstart (+1, schwarzer Kasten) liegt unmittelbar vor der durch das Anhängen des oligo (dT)-anchor Primers erzeugten Oligo-A-Sequenz. (A) Sequenzierungsergebnis im *Lp* Corby Wildtyp. (B) Sequenzierungsergebnis in der *Lp* Corby *AfleQ* Mutante. (C) Sequenzierungsergebnis in der *Lp* Corby *ArpoN* Mutante. (D) Sequenz *upstream* von *fliA*. Fettgedruckt sind das Startkodon (Pfeil), die Ribosomenbindungsstelle (RBS), der Transkriptionsstart (+1) und eine mögliche RpoD (σ^{70}) und/oder RpoS (σ^S) Bindungsstelle mit -35 Box, einem 16 Nukleotide langen Spacer (N_{16}) und -10 Box. Die Sequenzierung von der *AfleQ* Mutante und der *ArpoN* Mutante ergab denselben Transkriptionsstart von *fliA* wie im Wildtyp. N_{30} : nicht gezeigte identische Nukleotide.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass das 2-Komponentensystem LetA/LetS möglicherweise einen direkten oder über CsrA/CsrB einen indirekten Einfluss auf die *fliA* Expression hat (Molofsky and Swanson 2004; Molofsky et al. 2005). Aus diesem Grund wurde der Transkriptionsstart von *fliA* in einer $\Delta letA$ Mutante aus dem Stamm Lp02, einer Subspezies von *Lp* Philadelphia I, mittels RACE bestimmt. Die Kontrollen zeigten überall eindeutige Banden (Abb. 35, Spur: K1, K2, K3). Durch die erste RACE-PCR konnte nur wenig Produkt nachgewiesen werden, weshalb die PCR mit den Primern oligo (dT)-anchor

und FliA_RACE_3R wiederholt wurde und nun genügend PCR-Produkt detektiert werden konnte, um dieses zu sequenzieren.

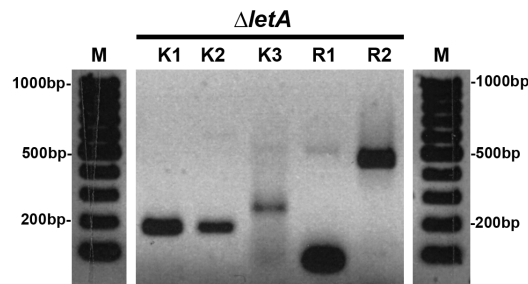


Abb. 35: Überprüfung der RACE-Reaktionen und Amplifikation der cDNA von *fliA* in der $\Delta letA$ Mutante im Stamm Lp02. Untersucht wurde die Promotorregion von *fliA* im Stamm Lp02 $\Delta letA$. Es wurden Kontroll-PCRs zur Überprüfung der cDNA Synthese (K1; Primer: neo3/for und neo2/rev; Produkt: 157 bp), der Aufreinigung der cDNA (K2; Primer: neo3/for und neo2/rev; Produkt: 157 bp) und das Anfügen des Poly-A-Schwanzes (K3; Primer: neo2/rev und oligo (dT)-anchor; Produkt: 293 bp) durchgeführt. Die Amplifikation des 5'Endes der *fliA* cDNA wurde mit den Primern oligo (dT)-anchor und FliA_RACE_2R durchgeführt (R1). Zur Erhöhung der Produktmenge wurde eine zweite PCR mit den Primern oligo (dT)-anchor und FliA_RACE_3R durchgeführt (R2) und das Produkt von etwa 500 bp anschließend sequenziert. Größenstandard: M, 100 bp DNA-Marker

Die Sequenzierung zeigte eindeutig die angehängte Poly-A-Sequenz (Abb. 36A). Der bestimmte Transkriptionsstartpunkt war derselbe wie im *Lp* Corby Wildtyp. Da sich die genomischen Sequenzen der Stämme Corby und Philadelphia sehr stark ähnlich sind, konnte ein direkter Abgleich erstellt werden (Abb. 36B). Man erkennt auch hier eine mögliche RpoD (σ^{70}) Bindungsstelle mit den entsprechenden Eigenschaften. Eine Mutation des *letA* Gens führt demnach zu keinem veränderten Transkriptionsstart von *fliA* und macht einen direkten Einfluss auf die *fliA*-Transkription unwahrscheinlich.

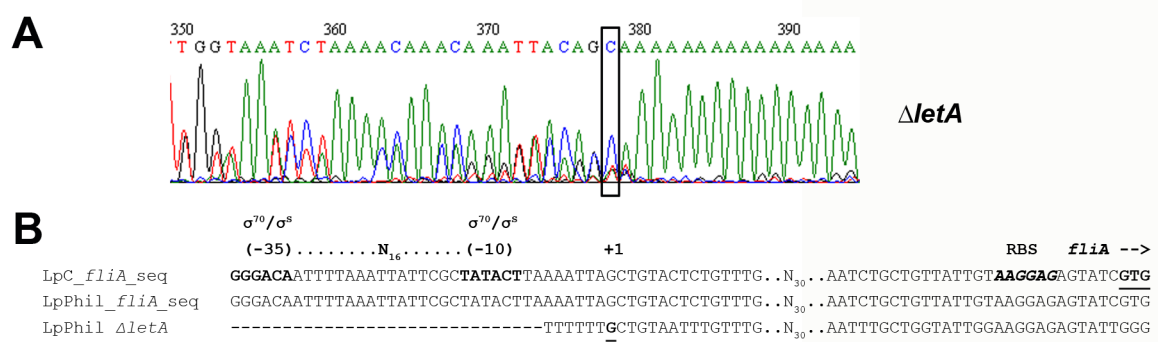


Abb. 36: Ergebnis der Sequenzierung des 5' Endes der *fliA* mRNA aus der $\Delta letA$ Mutante des Stammes Lp02. (A) Sequenzierungsergebnis des Produkts der RACE-PCR mit dem Primer FliA_RACE_3R. Der Transkriptionsstart (+1, schwarzer Kasten) liegt unmittelbar vor der durch das Anhängen des oligo (dT)-anchor Primers erzeugten Oligo-A-Sequenz. (B) Sequenz *upstream* von *fliA* aus *Lp* Corby Wildtyp und *Lp* Philadelphia Wildtyp. Fettgedruckt sind das Startkodon (Pfeil), die Ribosomenbindungsstelle (RBS), der Transkriptionsstart (+1) und eine mögliche RpoD (σ^{70}) und/oder eine RpoS (σ^S) Bindungsstelle mit -35 Box, einem 16 Nukleotide langen Spacer (N₁₆) und -10 Box. Die Sequenzierung von der $\Delta letA$ Mutante ergab denselben Transkriptionsstart von *fliA* wie im *Lp* Corby Wildtyp. N₃₀: nicht gezeigte identische Nukleotide.

4.3.7 Einfluss des alternativen σ^{28} Faktors FliA auf *lpc2402*

Frühere Microarray-Analysen aus dem Stamm *Lp* Paris gaben Hinweise für FliA als möglichen Regulator für das Gen *lpp0952* (Brüggemann et al. 2006). Das Gen besitzt GGDEF- und EAL-Domänen, welche die Konzentration von c-di-GMP kontrollieren. Eine Assoziation des homologen Gens *lpc2402* aus dem Stamm *Lp* Corby mit dem Phänotyp der $\Delta fliA$ Mutante wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Sowohl *lpp0952* als auch *lpc2402* besitzen circa 60 bp *upstream* des Start-Kodons eine putative FliA (σ^{28}) Bindungsstelle (TAAA-N₁₅-GCCGATAT).

Zunächst wurde die Expression von *lpc2402* während verschiedener Wachstumsphasen auf Transkriptionsebene untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus den Stämmen *Lp* Corby Wildtyp und *Lp* Corby $\Delta fliA$ Mutante isoliert und gereinigt. Die entnommenen Proben entsprachen der exponentiellen, der spät exponentiellen, der postexponentiellen und der stationären Phase der Bakterien (Kapitel 4.2.1). Der Nachweis von *lpc2402* erfolgte mit Hilfe von genspezifischen Primern aus 10 ng RNA und 30 Zyklen für die Reverse Transkriptase (RT-) PCR.

Während im LpC Wildtyp in der exponentiellen Phase keine *lpc2402*-RNA nachgewiesen wurde, zeigte sich ein starker Anstieg der Expression von *lpc2402* ab der spät exponentiellen Phase. Die Expression blieb bis zur stationären Phase auf sehr hohem Niveau (Abb. 37A, wt). Dies lässt auf eine vom bakteriellen Lebenszyklus abhängige Expression rückschließen. In der LpC Δ *fliA* Mutante konnte eine verzögerte Expression von *lpc2402* gezeigt werden. Dabei konnte erst ab der postexponentiellen Phase ein Produkt nachgewiesen werden (Abb. 37A, Δ *fliA*). Im Weiteren sank die RNA-Menge in der stationären Phase im Vergleich zum Wildtyp leicht. Eine Abhängigkeit der *lpc2402*-Expression von FliA konnte gezeigt werden. Die Vermutung aus den Microarray-Analysen, dass *lpc2402* durch FliA reguliert wird, konnte somit experimentell bestätigt werden. Da allerdings die *lpc2402*-Expression nur verzögert und nicht vollständig inhibiert war, muss es noch einen weiteren Faktor geben, der die Expression des Gens in den späten Wachstumsphasen steuert.

Da FliA der zentrale Regulator von FlaA ist, sollte ein weiteres Experiment einen möglichen Einfluss von *lpc2402* auf die Expression des Flagellins näher untersuchen. Dazu wurden die Stämme LpC Wildtyp und die Mutanten LpC Δ *flaA* und LpC Δ *lpc2402* auf BCYE-Agarplatten für 3 Tage bei 37°C inkubiert, was dem Wachstum der stationären Phase entsprach. Mittels 30 µg Gesamt-Zelllysate und SDS-PAGE wurden die Proteine der Größe nach aufgetrennt und anschließend auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen das Flagellin und entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert und deren Epitope spezifisch nachgewiesen.

Im LpC Wildtyp und der Δ *lpc2402* Mutante konnte bei einer Größe von etwa 48 kD eine deutliche und in beiden Stämmen gleich große Bande detektiert werden (Abb. 37B). Die Negativkontrolle der Δ *flaA* Mutante zeigte auf dieser Höhe keine Bande. Dies zeigte, dass das FliA-regulierte Gen *lpc2402*, im Gegensatz zu FliA selbst, keinen Einfluss auf die Flagellin-Expression von *L. pneumophila* Corby hat.

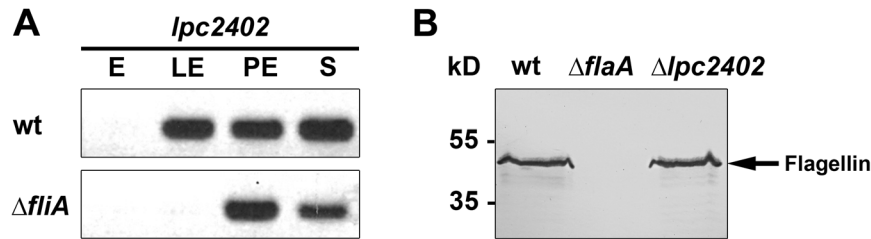


Abb. 37: Phänotypische Untersuchungen zum Einfluß von FliA auf *lpc2402*. (A) Aus Flüssigkulturen der Stämme *L. pneumophila* Corby Wildtyp (wt) und LpC $\Delta fliA$ Mutante ($\Delta fliA$) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und den entsprechenden Wachstumstumsphasen Proben entnommen und für die Reverse Transkriptase-PCR Analyse aufbereitet. Dazu wurde Gesamt-Zell RNA isoliert und anschließend gleiche Mengen (10 ng) für die Amplifikation genutzt. Für das Gen *lpc2402* wurden 30 Zyklen benötigt. Ein 2 % Agarose-Gel wurde mit gleichen Mengen PCR-Produkt beladen. (B) Für die Western Blot Untersuchungen wurden die Stämme LpC Wildtyp (wt), LpC $\Delta fliA$ und LpC $\Delta lpc2402$ drei Tage auf BCYE-Agarplatten bei 37°C angezüchtet. Anschließend wurden gleiche Mengen (30 µg) Gesamt-Zelllysate in einem 12 % Polyacryamid Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine Nitrozellulose-Membran wurden mit Antikörpern gegen Flagellin (FlaA, Pfeil) das spezifische Epitop nachgewiesen. Abkürzungen: E, exponentielle Wachstumsphase; LE, spät exponentielle (*late exponential*) Wachstumsphase; PE, postexponentielle Wachstumsphase; S, stationäre Wachstumsphase; kD, kiloDalton.

4.3.8 *In silico* Promotoranalysen

Viele Untersuchungen des Flagellensystems wurden in den letzten Jahren mit anderen Modellorganismen durchgeführt. Dazu zählen zum Beispiel *Escherichia coli* oder auch *Pseudomonas aeruginosa*. Aus diesen Studien konnten viele Erkenntnisse gewonnen werden, die aufgrund der großen Homologie des Flagellensystems zwischen verschiedenen Arten auch auf *Legionella* übertragen werden können.

In den letzten Jahren wurden Studien mit *Legionella* immer zahlreicher. Dabei wurden unter anderem die Promotorbereiche der wichtigsten regulatorischen Proteine des Flagellensystems von *L. pneumophila* näher untersucht und experimentell bestimmt. Dazu gehören die Promotoren von *fleQ*, dem Hauptregulator der Flagelle (Jacobi et al. 2004), *fleS*, einem Teil des 2-Komponentensystem für die Aktivierung der Expression der Klasse II Gene der Flagelle (Albert-Weissenberger et al. 2010) und *flaA*, dem strukturellen Hauptbestandteil der Flagelle (Heuner et al. 1995). Weiterhin konnte in Microarray-Versuchen eine starke Abhängigkeit der *fliM*-Expression von FleQ und RpoN gezeigt werden (Albert-Weissenberger 2008). Aus diesem Grund wurde auch dieser noch nicht experimentell bestimmte Promotor

näher untersucht. Zusammen mit den in dieser Arbeit untersuchten Promotoren von *flhF* und des alternativen σ^{28} Faktors *fliA* konnten nun die Promotoren von Regulatoren aus allen Bereichen der Flagellenkaskade untersucht werden. Mittels *in silico* Analysen und dem Programm *ClustalW* wurden die Promotoren dieser Gene von verschiedenen *Legionella* Stämmen betrachtet um auf mögliche Konsensus-Bereiche der Promotoren und den damit verbundenen Ähnlichkeiten zwischen den *Legionella* Stämmen in der Regulation rückschließen zu können. Dazu wurden die Sequenzen von jeweils etwa 200 bp vor dem Startpunkt des Proteins extrahiert und analysiert. Soweit die Promotorsequenz des entsprechenden Gens vorlag, wurden die 15 bereits beschriebenen *Legionella* Stämme untersucht (Kapitel 4.5.1). Die jeweiligen Sequenzen der untersuchten Promotoren der verschiedenen Stämme sowie deren *Alignments* sind im Anhang dieser Arbeit zu finden. Die mit *ClustalW* erstellten *Alignments* wurden für die grafische Darstellung anschließend mit dem Programm *Weblogo* der *University of California* in Berkeley, USA vereinfacht dargestellt (<http://weblogo.berkeley.edu/>). Eine mögliche Konsensussequenz der Promotoren wurde daraus extrahiert.

4.3.8.1 Promoteranalyse von *fleQ*

Jacobi und Kollegen konnten für den Transkriptionsstart von *fleQ* aus *Lp* Corby drei unterschiedliche Punkte experimentell bestimmen (Jacobi et al. 2004). Allerdings konnten nur für zwei dieser Punkte putative Promotorelemente gefunden werden. Diese überlappen einander und wurden aufgrund der Homologie zur σ^{70} Konsensussequenz (Potvin et al. 2008) dem Faktor RpoD zugesprochen. Die Sequenzen wurden in Tab. 14 noch einmal zusammengefasst.

In silico Analysen der *fleQ* Promotoren der 15 verschiedenen *Legionella* Stämme konnten in nahezu allen Stämmen ähnliche Bereiche finden. Dabei wurden jeweils beide Varianten der σ^{70} Konsensussequenz gefunden. Zwischen den *L. pneumophila* Stämmen gab es erwartungsgemäß sehr große Ähnlichkeiten. Dagegen konnten in den anderen Stämmen nur Teilsequenzen der Promotorregionen gefunden werden. In den Stämmen *L. hackelia*, *L. micdadei*, LLAP10 und LLAP12 wurden nur sehr geringe Ähnlichkeiten festgestellt. Zur besseren Übersicht wurden beide putative Promotorbereiche getrennt voneinander untersucht.

Die Bereiche des ersten Promotors konnten in allen sechs *L. pneumophila* Stämmen und LLAP10, LLAP12, *L. bozemanii*, *L. gormanii* und *L. longbeachae* gefunden werden. In *L.*

micdadei und *L. hackelia* waren diese Bereiche nicht eindeutig zu definieren und wurden deshalb nicht für die grafische Darstellung verwendet. In *L. oakridgensis* wurde kein *fleQ* Gen nachgewiesen. Die erstellte Konsensussequenz zeigte einen relativ hoch konservierten -10 Bereich des σ^{70} Faktors RpoD (Abb. 38A). Eine -35 Sequenz war nur sehr schwach konserviert. Im Weiteren ist die relativ hohe Konservierung der Sequenz des Spacerbereichs interessant. Einige Positionen konnten in allen Stämmen gefunden werden.

Für die Untersuchung des zweiten Promotors wurden nur die sechs *L. pneumophila* Stämme und LLAP10 verwendet. Alle anderen Sequenzen zeigten bei *Alignments* keine eindeutigen Homologien. Aufgrund der großen Ähnlichkeiten zwischen den *L. pneumophila*-Stämmen konnten kaum Unterschiede in den Promotorsequenzen gefunden werden (Abb. 38B). Sowohl der -35 als auch der Spacer und der -10 Bereich waren sehr hoch konserviert.

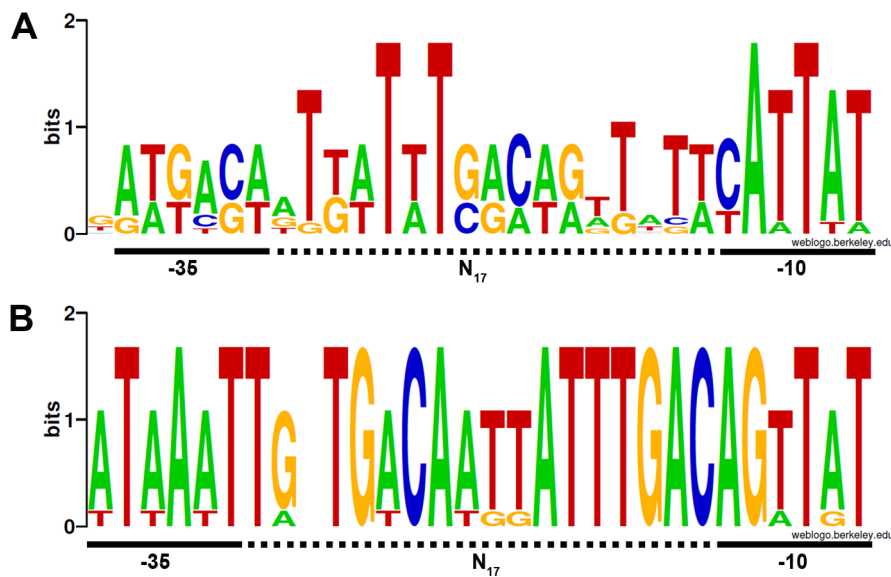


Abb. 38: Darstellung der Konsensussequenz der beiden *fleQ* Promotoren in *Legionella* mit putativer σ^{70} RpoD-Bindungsstelle. Nach dem *Alignment* mit *ClustalW* wurden die ähnlichen Sequenzen extrahiert und mit Hilfe von *Weblogo* grafisch aufbereitet. (A) Konsensussequenz des ersten Promotorbereichs aus dem *Alignment* der *L. pneumophila* Stämme sowie LLAP10, LLAP12, *L. bozemanii*, *L. gormanii* und *L. longbeachae*. (B) Konsensussequenz des zweiten Promotorbereichs aus dem *Alignment* der *L. pneumophila* Stämme sowie LLAP10. Abkürzungen: -35, -35 Bereich der Promotors; -10, -10 Bereich der Promotors; N₁₇, *Spacer* von 17 Nukleotiden.

Aufgrund der Tatsache, dass der erste Promotorbereich in nahezu allen untersuchten *Legionella* Stämmen gefunden wurde, kann eine erhöhte Affinität von σ^{70} an diesen Bereich vermutet werden. Möglicherweise wird in den *L. pneumophila* Stämmen die Expression von *fleQ* bei wechselnden äußeren Einflüssen über den zweiten Promotor reguliert. In Tab. 14 wurden die gefundenen Promotoren von *fleQ* zusammengefasst. Die vorliegenden Alignment Analysen zeigten einen sehr ähnlichen Promotorbereich für beide putativen σ^{70} Bindungsstellen. Eine dabei erstellte Konsensussequenz war den bereits bekannten aus *Lp* Corby sehr ähnlich (Tab. 14). Es konnte gezeigt werden, dass auch andere *Legionella* Stämme ähnliche Konsensusbereiche innerhalb des *fleQ* Promotors tragen.

Tab. 14: Promotorsequenz von *fleQ* aus *Legionella* mit putativer σ^{70} Bindungsstelle (RpoD). Der Bereich vor dem Spacer N_{17} ist die -35 Region, während der Bereich dahinter die -10 Region ist. Abkürzungen: *Ec*: *Escherichia coli*; *Lp*: *Legionella pneumophila*.

Gen / Konsensus	Sequenz	Referenz
σ^{70} Konsensus (<i>Ec</i>)	TTGACA-- N_{17} --TATAAT	(Potvin et al. 2008)
<i>fleQ</i> t_1 mit σ^{70} (<i>Lp</i>)	GTCACA-- N_{17} --CATTAT	(Jacobi et al. 2004)*
<i>fleQ</i> t_2 mit σ^{70} (<i>Lp</i>)	ATAAAT-- N_{17} --AGTTAT	(Jacobi et al. 2004)*
<i>fleQ</i> t_1 mit σ^{70}	A(T/A)(G/T)A(C/G)(A/T)-- N_{17} --CATTAT	Diese Arbeit [#]
<i>fleQ</i> t_2 mit σ^{70}	ATAAAT-- N_{17} --AGTTAT	Diese Arbeit [#]

*, experimentell bestimmter Promotor; [#], mittels *In silico* Analyse bestimmter Promotor

4.3.8.2 Promoteranalyse von *fleS*

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Promotor von *fleS* in *Lp* Paris eine putative σ^{70} RpoD-Bindungsstelle und *downstream* davon eine σ^{54} RpoN-Bindungsstelle besitzt (Albert-Weissenberger et al. 2010). Auch für *E. coli* wurden diese Bindungsstellen bereits beschrieben (Reitzer and Schneider 2001).

In silico Analysen konnten in allen vorliegenden *Legionella* Stämmen eine putative σ^{70} RpoD-Bindungsstelle nachweisen (Abb. 39A). Diese wiesen besonders in der -10 Sequenz große Ähnlichkeiten auf, während der vordere Teil der -35 Sequenz innerhalb der *Legionella*

Stämme relativ divers war. Auch waren große Gemeinsamkeiten in der *Spacer*-Region nachzuweisen.

Der *downstream* davon liegende Bereich der putativen σ^{54} RpoN-Bindungsstelle konnte ebenfalls in fast allen Stämmen gezeigt werden (Abb. 39B). Für die Stämme *L. micdadei* und *L. oakridgensis* konnte dieser Promotorbereich nicht gefunden werden. Dabei ist zu erwähnen, dass in *L. oakridgensis* auch kein *fleS* nachgewiesen werden konnte. Für den -10 Bereich wurden in nahezu allen Stämmen dieselben Nukleotide gefunden, während der -24 Bereich eine große Diversität aufwies. Auch diese Promotorregion zeigte im *Spacer*-Bereich große Ähnlichkeiten zwischen den Stämmen.

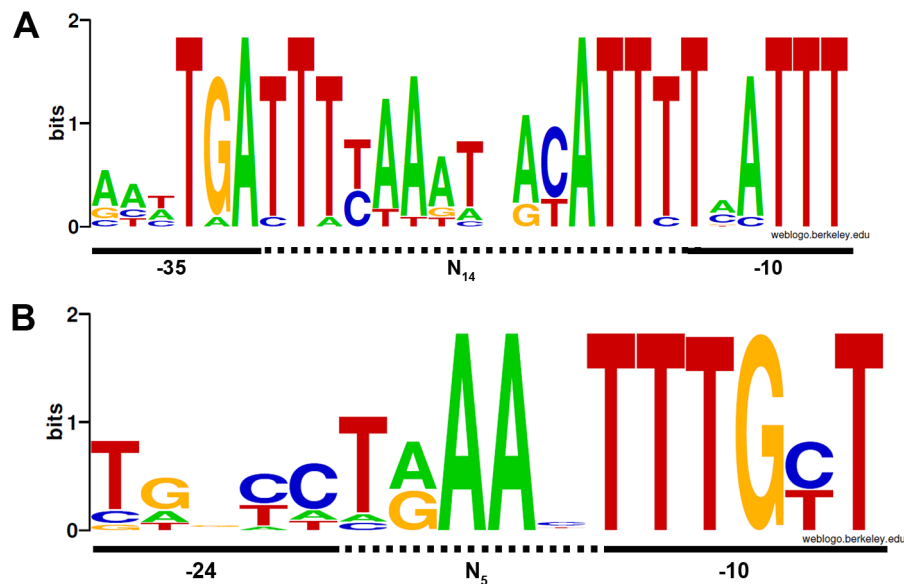


Abb. 39: Darstellung der Konsensussequenz der experimentell bestimmten *fleS* Promotoren in *Legionella*. Nach dem *Alignment* mit *ClustalW* wurden die ähnlichen Sequenzen extrahiert und mit Hilfe von *Weblogo* grafisch aufbereitet. (A) Konsensussequenz des Promotors aus dem *Alignment* aller untersuchten *Legionella* Stämme mit einer putativen σ^{70} RpoD-Bindungsstelle. (B) Konsensussequenz des Promotors aus dem *Alignment* aller untersuchten *Legionella* Stämme (bis auf *L. micdadei* und *L. hackelia*) mit einer putativen σ^{54} RpoN-Bindungsstelle. Abkürzungen: -35, -35 Bereich der Promotors; -24, -24 Bereich der Promotors; -10, -10 Bereich der Promotors; N, *Spacer* mit entsprechenden Nukleotiden.

Die aus den *in silico* Untersuchungen entstandenen Konsensussequenzen zeigten bis auf kleinere Abweichungen große Ähnlichkeiten zu den bereits bekannten Strukturen. Für das *fleS* Gen von *Legionella* konnten putative Konsensussequenzen definiert werden (Tab. 15)

Tab. 15: Promotorsequenzen von *fleS* aus *Legionella* mit experimentell bestimmter σ^{70} Bindungsstelle (RpoD) und σ^{54} Bindungsstelle (RpoN). Abkürzungen: *Ec*: *E. coli*; *Lp*: *L. pneumophila*.

Gen / Konsensus	Sequenz	Referenz
σ^{70} Konsensus (<i>Ec</i>)	TTGACA--N ₁₇ --TATAAT ^a	(Potvin et al. 2008)*
<i>fleS</i> mit σ^{70} (<i>Lp</i> Paris)	AATTGA--N ₁₄ --TAATTT ^a	(Albert-Weissenberger et al. 2010)*
<i>fleS</i> mit σ^{70}	AA(T/A)TGA--N ₁₄ --TNATTT ^a	Diese Arbeit [#]
σ^{54} Konsensus (<i>Ec</i>)	AA-N ₃ -TGGCAC(A/G)-N ₄ -TTGC(A/T)(A/T)T ^b	(Reitzer and Schneider 2001)*
<i>fleS</i> mit σ^{54} (<i>Lp</i> Paris)	TGGCCTGAACTTTGC ^c	(Albert-Weissenberger et al. 2010)*
<i>fleS</i> mit σ^{54}	TGN(C/T)C--N ₅ --TTTG(C/T) ^b	Diese Arbeit [#]

^a, der Bereich vor dem *Spacer* N_x ist die -35 Region, während der Bereich dahinter die -10 Region ist; ^b, der Bereich vor dem *Spacer* N_x ist die -24 Region, während der Bereich dahinter die -10 Region ist; ^c, keine eindeutige Einteilung der Promotorelemente möglich; *, experimentell bestimmter Promotor; #, mittels *In silico* Analyse bestimmter Promotor

4.3.8.3 Promotoranalyse von *fliM*

fliM ist das erste Gen eines sehr großen Operons mit wichtigen Flagellen-assoziierten Genen für Struktur- und Motorproteine (Abb. 49). Die Gene gehören zur Klasse II und III. Reguliert wird die Expression dieses Operons vermutlich über die Expression von *fliM*. Es wurde bereits in Microarray-Experimenten gezeigt, dass *fliM* wahrscheinlich durch FleQ und/oder RpoN reguliert wird (Albert-Weissenberger 2008). RpoN wirkt dabei als σ^{54} Faktor, während FleQ möglicherweise eine Bindung des σ^{70} Faktors an den -10 Bereich unterbinden kann (Dasgupta et al. 2002). Es sind bereits einige putative Konsensussequenzen für die σ^{54} RpoN-Bindungsstelle bekannt (Reitzer and Schneider 2001; Heuner and Steinert 2003) (Tab. 16). Experimentell konnte dieser Promotor allerdings noch nicht bestätigt werden.

Die *Alignment*-Untersuchungen mit *ClustalW* zeigten hoch konservierte -24 und -10 Bereiche einer putativen σ^{54} RpoN-Bindungsstelle (Abb. 40). Dabei wurden die Sequenzen aller Stämme bis auf LLAP12, *L. hackelia* und *L. lytica* analysiert. Die Stämme *L. longbeachae* und *L. oakridgensis* besitzen kein *fliM*.

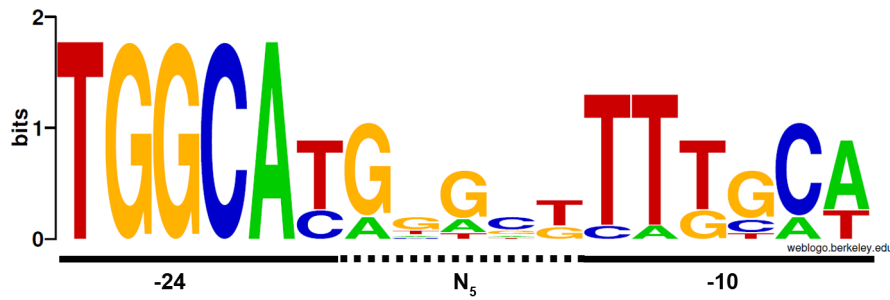


Abb. 40: Darstellung der Konsensussequenz des *fliM* Promotors aus dem *Alignment* der *L. pneumophila* Stämme sowie LLAP10, *L. micdadei*, *L. bozemanii* und *L. gormanii* mit einer putativen σ^{54} RpoN-Bindungsstelle. Nach dem *Alignment* mit *ClustalW* wurden die ähnlichen Sequenzen extrahiert und mit Hilfe von *Weblogo* grafisch aufbereitet. Abkürzungen: -24, -24 Bereich der Promotors; -10, -10 Bereich der Promotors; N₅, *Spacer* mit entsprechenden Nukleotiden.

Der Abgleich der erhaltenen Konsensussequenz zu anderen Motiven zeigte große Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Bakterienarten (Tab. 16). Dies spricht für eine hohe Homologie und eine starke Affinität des σ^{54} Faktors RpoN. Dies unterscheidet den Promotor von *fliM* von *fleS*.

Tab. 16: Promotorsequenz von *fliM* aus *Legionella* mit putativer σ^{54} Bindungsstelle (RpoN). Der Bereich vor dem *Spacer* N_{4/5} ist die -24 Region, während der Bereich dahinter die -10 Region ist. Abkürzungen: *Ec*: *E. coli*; *Lp*: *L. pneumophila*.

Gen / Konsensus	Sequenz	Referenz
σ^{54} Konsensus (<i>Ec</i>)	AA-N ₃ -TGGCAC(A/G)-N ₄ -TTGC(A/T)(A/T)T	(Reitzer and Schneider 2001)*
σ^{54} Konsensus (<i>Lp</i>)	TGGCAC--N ₅ --TTGCA	(Heuner and Steinert 2003) [#]
<i>fliM</i> mit σ^{54}	TGGCA(T/C)-N ₅ -TT(T/G)GC(A/T)	Diese Arbeit [#]

*, experimentell bestimmter Promotor; [#], mittels *In silico* Analyse bestimmter Promotor

4.3.8.4 Promoteranalyse von *flhF*

Der Promotor von *flhF* als vorgelagertes Gen von *fliA* wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der 5'RACE Methode bestimmt (Kapitel 4.3.6). Microarray-Daten zeigten eine mögliche Abhängigkeit der Expression von RpoN und FleQ und eine gemeinsame Expression der nachfolgenden Gene (Albert-Weissenberger 2008; Albert-Weissenberger et al. 2010). Um diese Theorie und einen möglichen Einfluss auf *fliA* näher zu untersuchen wurde der *flhF* Promotor bestimmt.

Für den Stamm *Lp* Corby konnte ein putativer σ^{54} Faktor (RpoN) mit einer -24 und einer -10 Box bestimmt werden (Abb. 31). Aufgrund der geringen Ähnlichkeit wurden die Stämme LLAP12, *L. bozemanii* und *L. lytica* nicht in die Betrachtung miteinbezogen. Das *Alignment* der Promotoren der verschiedenen *Legionella* Spezies zeigte eine hohe Homologie im Bereich der -24 Box, während die -12 Box eine größere Diversität aufwies (Abb. 41). Der in der $\Delta fleQ$ Mutante verschobene Transkriptionsstart zeigte eine weitere putative -10 Box. In diesem Bereich gab es größere Ähnlichkeiten zwischen den Stämmen.

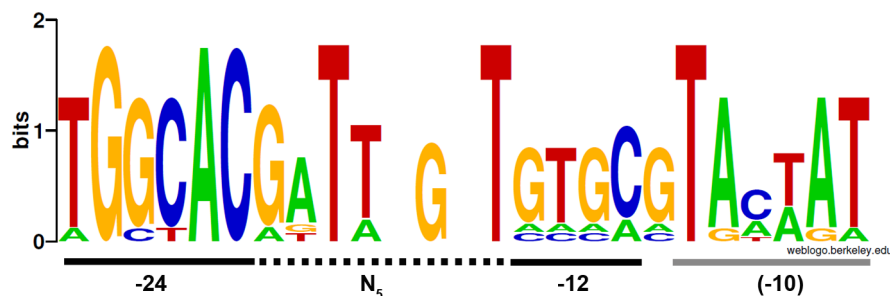


Abb. 41: Darstellung der Konsensussequenz des *flhF* Promotors aus dem *Alignment* der *L. pneumophila* Stämme sowie LLAP10, *L. micdadei*, *L. hackelia* und *L. gormanii* mit einer experimentell bestimmten σ^{54} RpoN-Bindungsstelle. Nach dem *Alignment* mit *ClustalW* wurden die ähnlichen Sequenzen extrahiert und mit Hilfe von *Weblogo* grafisch aufbereitet. Abkürzungen: -24, -24 Bereich der Promotors; -12, -12 Bereich der Promotors; -10, -10 Bereich einer weiteren putativen Promotorregion; N , *Spacer* mit entsprechenden Nukleotiden.

Die beobachtete Konsensussequenz von *flhF* zeigte große Ähnlichkeiten zu der bereits beschriebenen σ^{54} Bindungsstelle (Tab. 17) (Heuner and Steinert 2003). Die Gemeinsamkeiten zur Konsensussequenz aus *E. coli* waren sogar noch größer (Reitzer and Schneider 2001).

Tab. 17: Promotorsequenz von *flhF* aus *Legionella* mit experimentell bestimmter σ^{54} Bindungsstelle (RpoN). Der Bereich vor dem *Spacer* N₅ ist die -24 Region, während der Bereich dahinter die -12 Region ist. (fett). Außerdem ist eine zusätzliche mögliche -10 Region dargestellt (unterstrichen). Abkürzungen: *Ec*: *E. coli*; *Lp*: *L. pneumophila*.

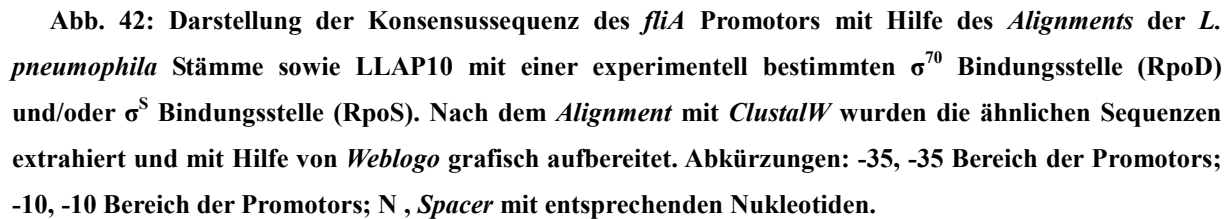
Gen / Konsensus	Sequenz	Referenz
σ^{54} Konsensus (<i>Ec</i>)	AA-N ₃ -TGGCAC(A/G)-N ₄ -TTGC(A/T)(A/T)T	(Reitzer and Schneider 2001)*
σ^{54} Konsensus (<i>Lp</i>)	TGGCAC--N ₅ --TTGCA	(Heuner and Steinert 2003) [#]
<i>flhF</i> mit σ^{54}	TGGCAC-N₅-<u>GTGCNTAC(T/A)AT</u>	Diese Arbeit* [#]

*, experimentell bestimmter Promotor; [#], mittels *In silico* Analyse bestimmter Promotor

4.3.8.5 Promoteranalyse von *fliA*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Transkriptionsstartpunkt von *fliA* bestimmt (Kapitel 4.3.6). Dabei wurde eine mögliche σ^{70} RpoD-Bindungsstelle identifiziert (Abb. 34). Bereits zuvor wurden Konsensussequenzen für diesen σ Faktor in *E. coli* beschrieben (Paget and Helmann 2003; Potvin et al. 2008). Im Weiteren wurde bereits eine Abhängigkeit der *fliA* Transkription vom σ^S Faktor RpoS in der späten exponentiellen Phase beschrieben (Bachman and Swanson 2001). Aufgrund dieser Vermutungen und der ähnlichen Struktur der Promotorelemente wurden in die vorliegenden Betrachtungen der Konsensussequenz von *fliA* in *Legionella* auch Konsensussequenzen von σ^S abhängigen Promotoren miteinbezogen (Lacour and Landini 2004; Hovel-Miner et al. 2009).

Für die Bestimmung einer Konsensussequenz für den *fliA* Promotor konnten aufgrund der geringen Homologie nur die *L. pneumophila* Stämme und LLAP10 miteinander abgeglichen werden. Aus diesem Grund zeigte die Promotorregion sehr große Homologien zwischen den Stämmen. Über den gesamten untersuchten Promotorbereich war die Sequenz nahezu identisch (Abb. 42). Die -35 und -10 Bereiche wurden eindeutig identifiziert. Die Elemente zeigten Gemeinsamkeiten zu konservierten σ^{70} bzw. σ^S Bindungsstellen aus *E. coli*. Auch die A/T-reiche Region *downstream* des -10 Elements wurde gezeigt. Weiterhin ist zu erwähnen, dass der gesamte Spacer-Bereich ebenfalls eine sehr große Ähnlichkeit zwischen den untersuchten Stämmen aufwies.



Tab. 18: Promotorsequenzen von *flaA* aus *Legionella* mit experimentell bestimmter σ^{70} Bindungsstelle (RpoD) und/oder σ^S Bindungsstelle (RpoS). Der Bereich vor dem *Spacer* N₁₆ ist die -35 Region, während der Bereich dahinter die -10 Region ist (fett und unterstrichen). Für RpoS ist nur die Konsensussequenz der -10 Region konserviert (unterstrichen). Abkürzungen: *Ec*: *E. coli*; *Lp*: *L. pneumophila*.

* , experimentell bestimmter Promotor; # , mittels *In silico* Analyse bestimmter Promotor; § , -10 Element

4.3.8.6 Promoteranalyse von *flaA*

Bereits 1990 konnte in *P. aeruginosa* ein Zusammenhang zwischen dem σ^{28} Faktor FliA und der Expression des Flagellins *flaA* hergestellt werden (Totten and Lory 1990). Einige Zeit später wurde diese Abhängigkeit auch in *L. pneumophila* gefunden (Heuner et al. 1995). Es wurde gezeigt, dass die Promotorregion für *flaA* zwischen verschiedenen Arten hoch konserviert ist. Dies unterstreicht die Bedeutung des Flagellins als wichtigstes Strukturprotein der Flagelle.

Für die Promotoranalysen konnten alle untersuchten Stämme benutzt werden. Bis auf *L. longbeachae* und *L. oakridgensis*, welche kein Flagellensystem besitzen, zeigte sich in allen Stämmen ein nahezu identischer Promotorbereich (Abb. 43). Beide Promotorelemente konnten in allen untersuchten *Legionella* Genomen nachgewiesen werden und waren nahezu identisch.

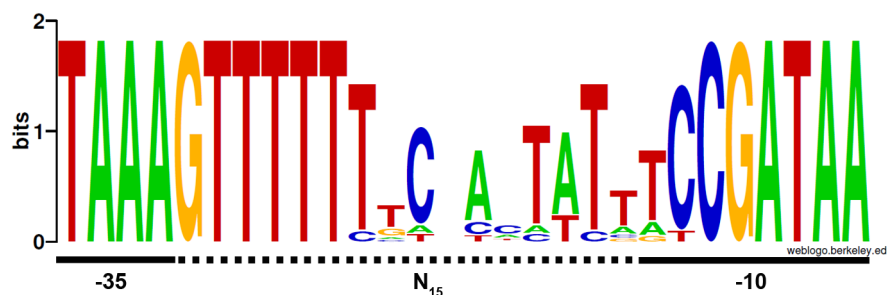


Abb. 43: Darstellung der Konsensussequenz des *flaA* Promotors aus dem *Alignment* der hier untersuchten, flagellierten *Legionella* Stämme mit einer experimentell bestimmten σ^{28} FliA-Bindungsstelle. Nach dem *Alignment* mit *ClustalW* wurden die ähnlichen Sequenzen extrahiert und mit Hilfe von *Weblogo* grafisch aufbereitet. Abkürzungen: -35, -35 Bereich der Promotors; -10, -10 Bereich der Promotors; N , *Spacer* mit entsprechenden Nukleotiden.

Die abgeleitete Konsensussequenz des *flaA* Promotors entsprach der bereits beschriebenen (Heuner et al. 1995). Sogar zu *P. aeruginosa* war der Promotor von *Legionella* nahezu identisch. Erstaunlicherweise konnte dies nur für den Flagellin-Promotor in dieser Ausprägung gefunden werden. Es konnte nicht nur die Ähnlichkeiten innerhalb einer Art oder Familie, sondern sogar innerhalb der Klasse der γ -Proteobakterien gezeigt werden.

Tab. 19: Promotorsequenz von *flaA* aus *Legionella*. Der Bereich vor dem *Spacer* N₁₅ ist die -35 Region, während der Bereich dahinter die -10 Region ist. Abkürzungen: *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *Lp*: *L. pneumophila*.

Gen / Konsensus	Sequenz	Referenz
σ^{28} Konsensus (<i>Pa</i>)	TAAA--N ₁₅ --GCCGATAA	(Totten and Lory 1990)*
σ^{28} Konsensus (<i>Lp</i>)	TAAA--N ₁₅ --TCCGATAA	(Heuner et al. 1995)*
<i>flaA</i> mit σ^{28}	TAAA--N ₁₅ --TCCGATAA	Diese Arbeit [#]

*, experimentell bestimmter Promotor; [#], mittels *In silico* Analyse bestimmter Promotor

4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Flagelle

Nachdem vorangegangene Versuche einen Einblick in die Regulation der Flagelle auf Ebene der mRNA und der Proteine gegeben haben, wurde im Folgenden die Morphologie der Flagelle mittels Elektronenmikroskopie (EM) näher untersucht. Frühere Studien zeigten, dass die $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ Mutanten nicht flagelliert sind, aber das Flagellin exprimiert wird (Jacobi et al. 2004). Es wurde vermutet, dass ein Basalkörper und damit die Basis der Flagelle nicht gebildet werden kann. Um diese Hypothese zu bestätigen wurden im Rahmen dieser Arbeit der *Lp* Corby Wildtyp und die Mutanten $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta fliA$, $\Delta flaA$ und $\Delta fliD$ in YEB-Flüssigmedium bei 30°C und unter langsamen Schütteln angezüchtet, abzentrifugiert und für die Elektronenmikroskopie präpariert. Abschließend wurden Übersichtsbilder von Gruppen von Bakterien und Detailaufnahmen von den Polen der Zellen angefertigt.

Sowohl das Übersichtsbild als auch die Detailaufnahme von *Lp* Corby Wildtyp zeigten polar begeißelte Stäbchenbakterien (Abb. 44A, A', Pfeil). Aufgrund von Scherkräften während der Präparation brachen einige Geißeln ab und somit konnten nicht alle der gefundenen Flagellen einer Zelle zugeordnet werden. Die Detailaufnahme zeigte eine Flagelle, welche aus der polaren Region der Zelle austritt (Abb. 44A'). Ein Basalkörper oder eine gebogene *Hook* Struktur waren nicht zu erkennen, trotzdem waren die Bakterien motil (nicht gezeigt, mikroskopische Beobachtung).

Die Mutanten $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ waren nicht motil und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten auch keine Flagelle (Abb. 44B, C). Detailaufnahmen zeigten keine Strukturen (Basalkörper, *Hook*) an den polaren Regionen der Bakterien (nicht gezeigt), was bereits veröffentlichte Daten bestätigte (Jacobi et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass FleQ als wichtigster Regulator zusammen mit RpoN für einen kontrollierten Aufbau der Flagelle sorgt. Ohne FleQ und RpoN wird der Basalkörper des Flagellenapparates nicht gebildet und somit entsteht auch keine Flagelle.

Wie bereits Ergebnisse zur Transkription und Translation in der $\Delta fliA$ Mutante gezeigt haben, wurde das Flagellin-Gen kaum exprimiert und es waren nur sehr geringe Mengen Protein nachweisbar. Die EM-Aufnahmen konnten nun zeigen, dass auch diese Mutante nicht begeißelt ist (Abb. 44D'). Die Detailaufnahme konnte jedoch eine auffällige, gerade Struktur in der polaren Region der Zellen zeigen (Abb. 44D, Pfeil). Es ist wahrscheinlich, dass es sich hierbei um den *Hook* handelt. Der *Hook* benötigt den Basalkörper für die Verankerung in der Membran und somit konnte letzterer indirekt nachgewiesen werden. Da das Flagellin-Protein

nicht in ausreichenden Mengen gebildet wurde, konnte das Filament nicht ausgebildet werden. Das besondere an diesem *Hook* ist die gerade Struktur. Anders als bei *E. coli* oder *Salmonella* ist dieser nicht gebogen. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass gerade *Hook* Strukturen durch Präparationen unter Bedingungen mit sauren pH-Wert oder geringen Temperaturen künstlich hergestellt wurden (Kagawa et al. 1979; Hirano et al. 1994). Um diese Möglichkeit auszuschließen wurden Präparationen mit verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen durchgeführt. Diese gerade Struktur wurde jedoch sowohl unter neutralen bzw. sauren Bedingungen und bei Raumtemperatur bzw. 4°C gefunden (nicht gezeigt). Die Struktur eines geraden *Hooks* wurde bisher für *Legionella* nicht beschrieben.

Zur Überprüfung der $\Delta fliA$ Mutante und deren morphologischen Phänotyps wurde die $\Delta flaA$ Mutante verwendet. In dieser Mutante ist nur das Flagellin-Gen inaktiviert. Andere Einflüsse auf das Flagellensystem, welche durch das Ausschalten des Regulators FliA möglich wären, sind hier nicht zu erwarten. Eine Übersichtsaufnahme konnte ebenfalls keine Flagelle detektieren, ebenso wenig war Motilität festzustellen (Abb. 44E'). Bei näherer Betrachtung der polaren Regionen der Bakterien konnte auch bei der $\Delta flaA$ Mutante eine gerade *Hook* Struktur beobachtet werden (Abb. 44E, Pfeil). Diese glich in Form und Aussehen der Struktur der $\Delta fliA$ Mutante.

Nach der Bildung von Basalkörper und *Hook* wird durch den entstandenen Kanal das Flagellin zur Spitze des *Hooks* geschleust und dort zur Flagelle assembliert. Dabei bildet das FliD Protein den Abschluss dieses Kanals, der auch als *Cap* bezeichnet wird. Das Protein sorgt dabei für die korrekte Assemblierung des Flagellins zum Filament und verhindert das unkontrollierte Ausschleusen des Flagellins aus der Zelle (Molofsky et al. 2005). Die Untersuchung der $\Delta fliD$ Mutante zeigte nicht-flagellierte Bakterien und eine gerade *Hook* Struktur am Pol der Zelle (Abb. 44F, F', Pfeil). Auch hier ist die Struktur in Form und Größe der von der $\Delta fliA$ und der $\Delta flaA$ Mutante vergleichbar. Obwohl dieser Stamm das Flagellin Gen besitzt und auch exprimiert, kam es zu keiner Ausbildung des Filaments.

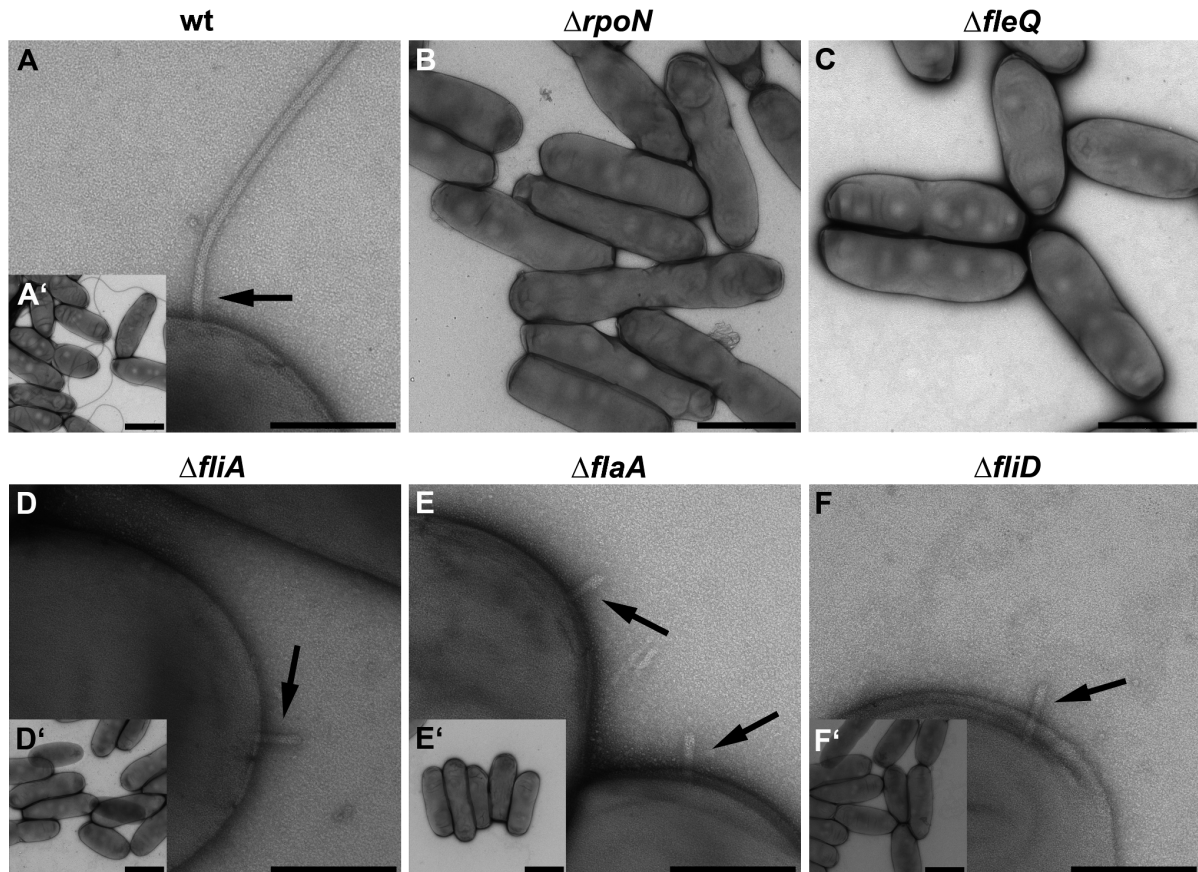


Abb. 44: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Flagellenexpression in *L. pneumophila* Corby (LpC) und verschiedenen Mutantenstämmen. Die Bakterien wurden in YEB-Medium bei 30°C und langsamer Schüttelbewegung für einen Tag angezogen. Durch Negativ-Kontrastierung mit 0,5 % Uranylacetat wurden die Bakterien auf Pioloform-F beschichteten Kupfernetzen gefärbt und mittels TEM 902 analysiert. (A, A') *L. pneumophila* Corby Wildtyp (wt); (B) LpC $\Delta rpoN$ Mutante; (C) LpC $\Delta fleQ$ Mutante; (D, D') LpC $\Delta fliA$ Mutante; (E, E') LpC $\Delta flaA$ Mutante; (F, F') LpC $\Delta fliD$ Mutante. Pfeile zeigen die polare Flagelle oder die polaren Hook Strukturen. Balken (Übersicht; A-F): 1 μ m; Balken (Detail; A', D'-F'): 200 nm.

Um auszuschließen, dass diese Struktur ein Artefakt der Präparation ist, wurden Bakterien des *Lp* Corby Wildtyps und der LpC $\Delta flaA$ Mutante nach der Fixierung für die Elektronenmikroskopie mit polyklonalen Antikörpern gegen die abgeschnittene Flagelle des Wildtyps inkubiert. Diese Antikörper wurden in einem zweiten Schritt durch monoklonale Gold-gekoppelte Antikörper nachgewiesen.

Der Wildtyp zeigte eine Lokalisation der Goldkugeln über die gesamte Struktur des Flagellenapparates (Abb. 45A, A', A''). Die Detailaufnahme zeigte deutlich den Austritt der Flagelle am Pol der Zelle (Abb. 45A''). Direkt hinter der Membran konnten einzelne

Goldkügelchen nachgewiesen werden. Der restliche Teil des Bakteriums zeigte keine Akkumulationen von Gold. Der Hintergrund des Trägermaterials zeigte dieselbe zufällige Verteilung von Goldkügelchen.

Die Untersuchung der $\Delta flaA$ Mutante konnte Goldkügelchen nur am polaren Ende der Zellen nachweisen (Abb. 45B, B', B''). Eine gerade *Hook*-Struktur konnte wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden (Abb. 45B', Pfeil). Die Lokalisation der Goldkügelchen beschränkte sich ebenfalls nur auf diese Struktur (Abb. 45B''). Dadurch wurde bestätigt, dass es sich bei dieser Struktur um den *Hook* des Flagellenapparates handelt.

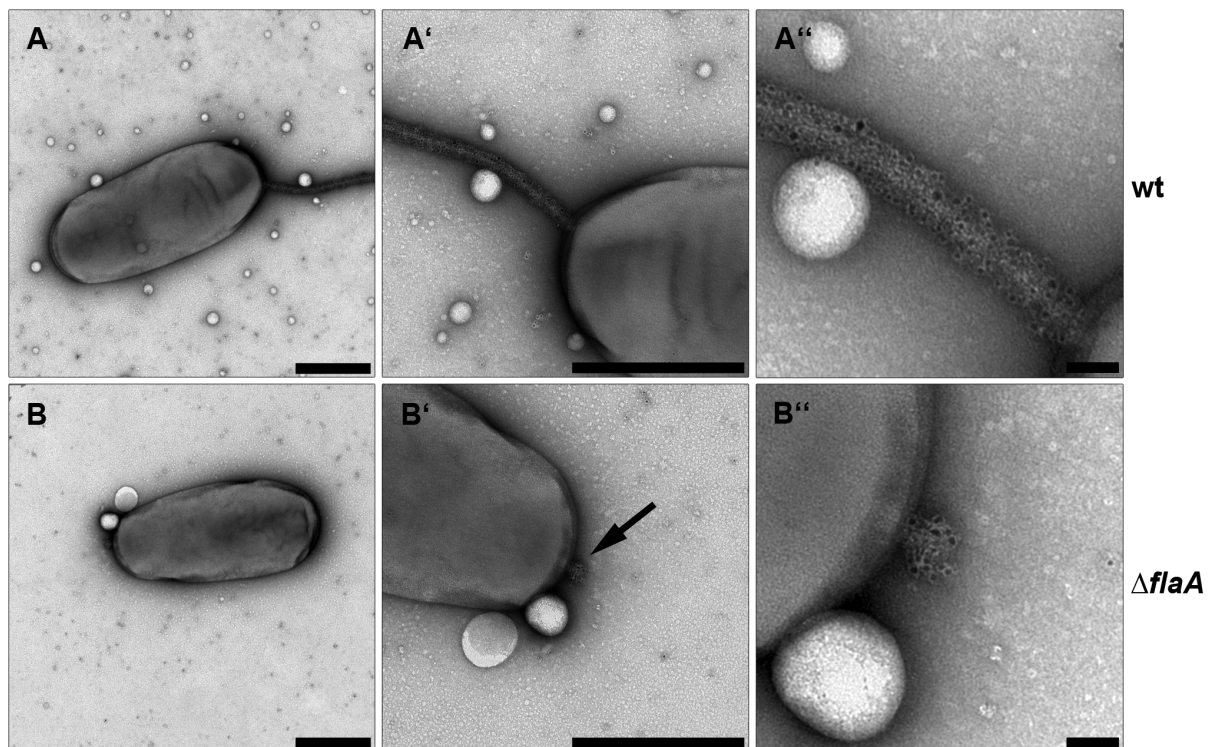


Abb. 45: Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern gegen den Flagellenapparat. Die untersuchten Stämme (A, A', A'') *L. pneumophila* Corby (LpC; wt) und (B, B', B'') die LpC $\Delta flaA$ Mutante ($\Delta flaA$) wurden in YEB-Medium bei 30°C und langsamer Schüttelbewegung für einen Tag angezogen. Durch Negativ-Kontrastierung mit 0,5 % Uranylacetat wurden die Bakterien auf Pioloform-F beschichteten Kupfernnetzen gefärbt und mittels TEM 902 analysiert. Die fixierten Zellen wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen die abgescherte Flagelle inkubiert und diese mittels Goldgekoppelten Sekundär-Antikörpern detektiert. Der Pfeil zeigt den *Hook* der $\Delta flaA$ Mutante. Balken (Übersichten; A, A' und B, B'): 500 nm; Balken (Detail; A'' und B''): 40 nm.

4.5 Der Aufbau des Flagellen-Regulons von *Legionella* – Eine *In silico* Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Stamm *L. pneumophila* Corby intensiv untersucht. Dabei ist das Vorhandensein der vollständigen Genomsequenz eines Stammes ein großer Vorteil. Mit diesen Informationen kann auf das Vorkommen von Genen und Proteinen, aber auch auf Stoffwechselsysteme und Regulationskaskaden rückgeschlossen werden. Nicht nur die Betrachtung der vertikalen Evolution verschiedener genetischer Systeme erbringt dabei die nötigen Informationen. Heutzutage erkennt man immer mehr die Wichtigkeit des horizontalen Austausches von genetischen Informationen. Durch horizontalen Gentransfer können Gene selbst zwischen unterschiedlichen Arten ausgetauscht werden. Natürlich können wichtige Systeme auch parallel in verschiedenen Organismen entwickelt werden. Viele dieser Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Arten kann man mittels *in silico* Analysen der Genome aufzeigen und diskutieren. In dieser Arbeit durchgeführte Analysen bezüglich genusuniformer Gemeinsamkeiten und stammspezifischer Unterschiede bei der Betrachtung des Flagellenregulons können wichtige Informationen zur Verbreitung und Bedeutung genetischer Elemente liefern. Besonders in einer Zeit, in der ganze Genome viel einfacher zu sequenzieren sind als vor 20 Jahren, werden solche Informationen immer besser zugänglich und können experimentelles Vorgehen ersetzen oder unterstützen.

4.5.1 Verschiedene *Legionella* Stämme

Bisher ist nicht bekannt was hochpathogene von weniger pathogenen Stämmen unterscheidet. Alle in dieser Arbeit untersuchten Stämme haben bereits zu Infektionen beim Menschen geführt. Es gibt aber sehr große Unterschiede zwischen den Stämmen. Zu den hochpathogenen gehören *L. pneumophila* ssp. und *L. longbeachae*, während Stämme wie *L. bozemanii*, *L. gormanii* oder *L. oakridgensis* nur sporadisch Infektionen beim Menschen auslösen. Besonders selten ist dabei *L. oakridgensis*, der in den vergangenen Jahrzehnten nur dreimal aus Patienten isoliert werden konnte (Tang et al. 1985; Lo Presti et al. 2000). Zurzeit sind für *Legionella* 51 Spezies mit mindestens 73 Serogruppen bekannt (Lück 2011) (www.dsmz.de; www.bacterio.cict.fr/). *Lp* Corby wurde erst vor vier Jahren vollständig sequenziert und war der vierte *L. pneumophila* Stamm, der analysiert wurde (Glöckner et al. 2008). Zuvor wurden im Jahr 2004 die *L. pneumophila* Stämme *Lp* Philadelphia I, *Lp* Lens und *Lp* Paris komplett sequenziert (Cazalet et al. 2004; Chien et al. 2004). Im vorletzten Jahr

kam als weiterer *L. pneumophila* Stamm *Lp Alcoy* dazu (D'Auria et al. 2010). Außerdem wurden im Jahr 2010 mit *L. longbeachae* NSW150 und D-4968 zwei Isolate eines non-*pneumophila* Stammes auf Genomebene untersucht (Cazalet et al. 2010; Kozak et al. 2010). Im Weiteren ist der Stamm *L. drancourtii* LLAP12 (*Legionella-like amoebal pathogen 12*) als Teilsequenz verfügbar (Moliner, 2009, www.pubmed.org). In der Natur wie auch in künstlichen Habitaten kommen Legionellen oft auch Biofilm-assoziiert vor. Aus diesem Grund sollten für das Verständnis eines großen Lebensraums weitere *Legionella* Spezies untersucht werden, die primär nicht mit Infektionen des Menschen verbunden sind.

Für diese Arbeit wurden von Prof. Carmen Buchrieser (Pasteur Institut, Paris) Teile von Genomsequenzen verschiedener *Legionella* Stämme zur Verfügung gestellt. Zu diesen Stämmen gehören *L. micdadei*, *L. hackelia* und LLAP10 (*Legionella-like amoebal pathogen 10*, *L. fallonii*). Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Stämme sequenziert. Dazu zählen *L. bozemanii*, *L. gormanii*, *L. lytica*, *L. oakridgensis* und *L. pneumophila* Togus-1 (Sg2). Während *L. pneumophila* Stämme häufig bei Infektionen des Menschen gefunden werden können, kommen die LLAP Stämme in Assoziation mit Amöben vor (La Scola et al. 2004). Die Stämme *L. micdadei* (Brenner et al. 1979) und *L. bozemanii* (Brenner et al. 1979; Hébert et al. 1980) wurden nach ihrer Entdeckung zunächst zu anderen Spezies gezählt, später aber *Legionella* zugeordnet (Garrity et al. 1980). Das Gleiche gilt für die Stämme *L. gormanii* (Morris et al. 1980; Brown et al. 1981) und *L. lytica* (Springer et al. 1992; Palusinska-Szyszt et al. 2001). Die weiteren Stämme wurden in den Jahren nach dem ersten Ausbruch der Legionärskrankheit entdeckt – *L. hackelia* (Wilkinson et al. 1985), *Lp* Togus-1 (Brenner et al. 1979) und *L. oakridgensis* (Orrison et al. 1983).

All diese Stämme sind mehr oder weniger häufig vorkommende Umweltisolate, die aber nur selten den Menschen infizieren. Trotzdem wurden bisher wurden die Hälfte aller bekannter Spezies als Ursache von Infektionen beim Menschen beschrieben (Lück 2011). Das Ausbilden des Flagellenapparates zählt zu den wichtigen Virulenzmerkmalen von *Legionella*. Das Vorkommen der Flagelle und der assoziierte Gene des Flagellen-Regulons sind in vielen dieser Stämme unbekannt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in silico* Analysen von hochpathogenen Erregern und anderen häufig in der Umwelt vorkommenden Isolaten sollten mögliche Unterschiede in Bezug auf den Virulenzfaktor „Flagelle“ zugänglich machen. Dazu wurden die genannten vollständigen oder teilsequenzierten Genome auf das Vorkommen aller mit dem Flagellensystem oder dem Chemotaxissystem assoziierten Gene untersucht. Im Weiteren

wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Phänotyp der verschiedenen Stämme durchgeführt. Schließlich wurden bereits bekannte und in dieser Arbeit neu gefundene Promotorbereiche wichtiger regulatorischer Gene in den Stämmen mittels vergleichender *in silico* Studien untersucht.

4.5.2 Genotypische Untersuchung verschiedener *Legionella* Stämme

Für die Expression von Genen ist nicht nur eine funktionelle Gensequenz nötig, sondern auch die benachbarten genomischen Bereiche. Dort können weitere Regulatoren und aktivierende oder reprimierende Bereiche liegen, die für die Expression wichtig sind. Auch kann durch den Aufbau der genomischen Nachbarregionen auf mögliche Operonstrukturen rückgeschlossen werden. Schließlich können Gene über horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien ausgetauscht werden, wobei meist ganze DNA-Abschnitte übertragen werden. Um all diese Aspekte in die Untersuchungen einfließen zu lassen, wurden nicht nur die Gene des Flagellenregulons mit einbezogen, sondern auch die benachbarte genomische Region, in der diese Gene liegen.

Da Flagellen- und Chemotaxissystem in anderen Bakterienspezies funktionell zusammen gehören wurde im Rahmen dieser Arbeit das Chemotaxissystem in die *in silico* Analysen miteinbezogen. Experimentell konnte bei *Legionella* bisher keine chemotaktische Fortbewegung gezeigt werden. Interessanterweise wurde bei der Sequenzierung des Stammes *L. longbeachae* ein solches System entdeckt, wobei die Gene analog zum System von *E. coli* sind (Cazalet et al. 2010; Kozak et al. 2010). Erstaunlicherweise besitzt der Stamm aber kein Flagellensystem. Der Stamm *L. longbeachae* NSW150 wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Genomebene näher betrachtet und die Genomsequenzen der anderen *Legionella* Stämme in Bezug auf das putative Chemotaxissystem ausgewertet.

Die folgenden Abbildungen zeigen die schematische Darstellung der *in silico* Abgleiche (Abb. 46 bis Abb. 52). Erstellt wurden diese Abgleiche durch Computeranalysen mit dem Programmen *Artemis* (Genom Browser, Annotation, Visualisierung), *BLAST* (Sequenz-Abgleich auf DNA- und Protein-Ebene), *Geneious* (Sequenz-Abgleich, Annotation) und der *Pedant* Datenbank. Dabei wurden jeweils einzelne Gencluster zusammengestellt. Die Reihenfolge der verschiedenen Operone entspricht dem Vorkommen innerhalb des Genoms von *Lp* Corby. Der Beginn eines ringförmigen Bakteriengenoms wird mit dem Replikationsursprung (*origin of replication*, *oriC*) definiert. Aus diesem Grund ist eine lineare

Sortierung von Operonen möglich. Jedes Operon wurde jeweils nach dem ersten *upstream* liegenden Gen benannt. Die Gene des Flagellensystems bzw. des chemotaktischen Systems wurden als rote bzw. blaue Pfeile dargestellt. Gene, welche nicht diesen Systemen angehören, sondern in den Nachbarregionen lokalisiert und ortholog zueinander sind, wurden schwarz gezeigt. Gene mit unbekannter Funktion, welche innerhalb dieser Operone inseriert wurden, erhielten die Farbe grün. Das Vorhandensein von Genen wurde mittels dicker Pfeile dargestellt, während das Fehlen durch dünne Pfeile gezeigt wurde. Weiterhin entspricht die Länge der Pfeile in etwa der Größe der Gene (Größen von <500 bp bis >2.000 bp). Die Nomenklatur der Gene des Flagellenregulons entsprach der von *Lp* Corby. Beim Chemotaxissystem war *L. longbeachae* NSW150 das Referenzgenom. Bei andersartigen Benennungen wurde zur Vereinfachung die Bezeichnung nicht separat dargestellt. Die untersuchten Stämme wurden wie folgt bezeichnet: *L. pneumophila* Corby (LpC), *L. pneumophila* Paris (LpP), *L. pneumophila* Lens (LpL), *L. pneumophila* Philadelphia I (LpPhil), *L. pneumophila* Alcoy (LpAlc), *L. pneumophila* Togus-1 (LpTogus), *Legionella-like amoebal pathogen* 10 / *L. fallonii* (LLAP10), *Legionella-like amoebal pathogen* 12 / *L. drancourtii* (LLAP12), *L. micdadei* (Lmic), *L. hackelia* (Lhack), *L. bozemanii* (Lboze), *L. gormanii* (Lgorm), *L. lytica* (Llyti), *L. longbeachae* NSW150 (Llong) und *L. oakridgensis* (Loak).

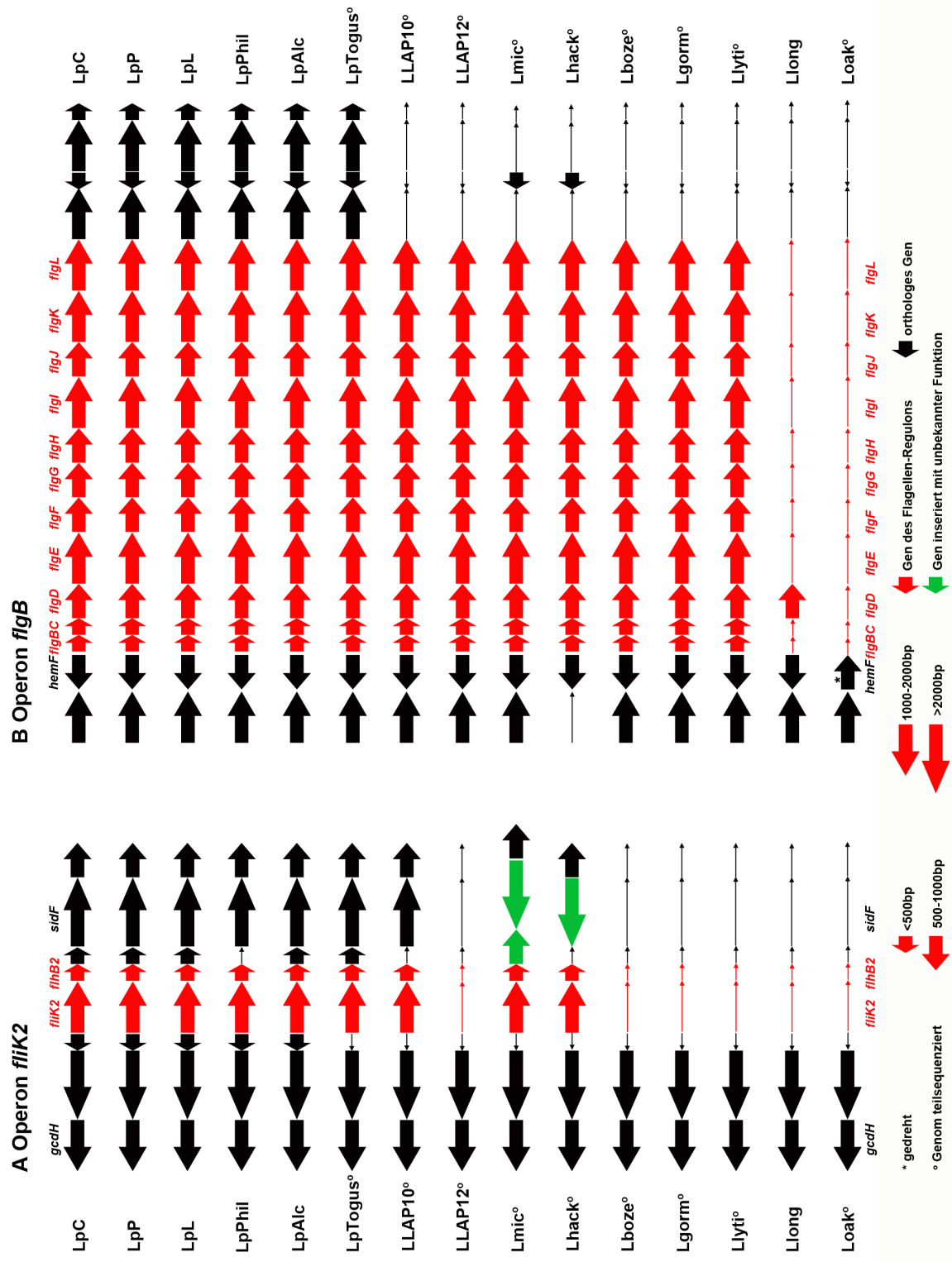


Abb. 46: *In silico* Analyse des Flagellen-Regulons. Teil 1. (A) Operon *fliK2*. (B) Operon *flgB*. Für Stammbezeichnungen siehe Tab. 5 und Kapitel 4.5.2.

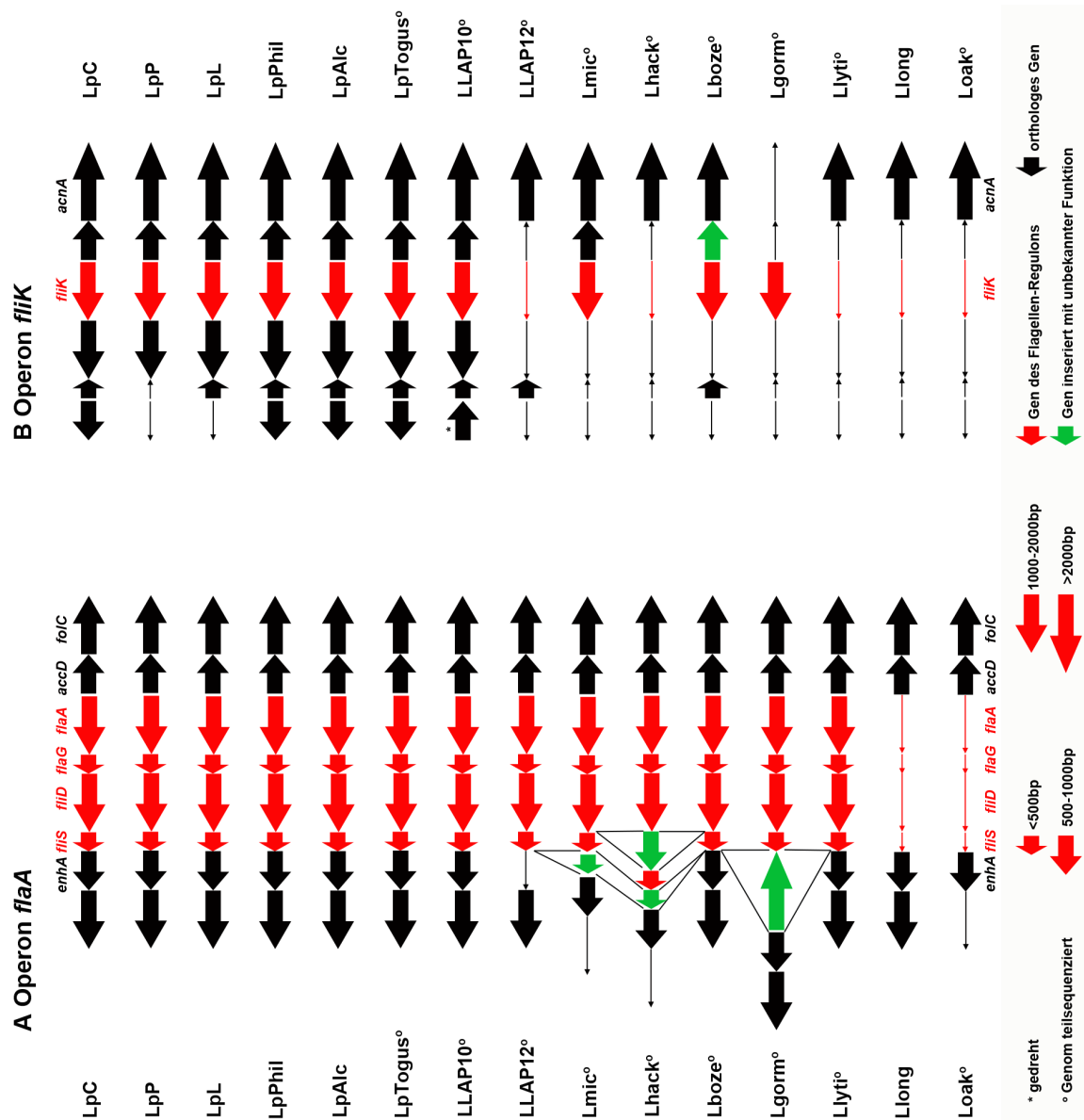


Abb. 47: *In silico* Analyse des Flagellen-Regulons. Teil 2. (A) Operon *flaA*. (B) Operon *fliK*. Für Stammbezeichnungen siehe Tab. 5 und Kapitel 4.5.2.

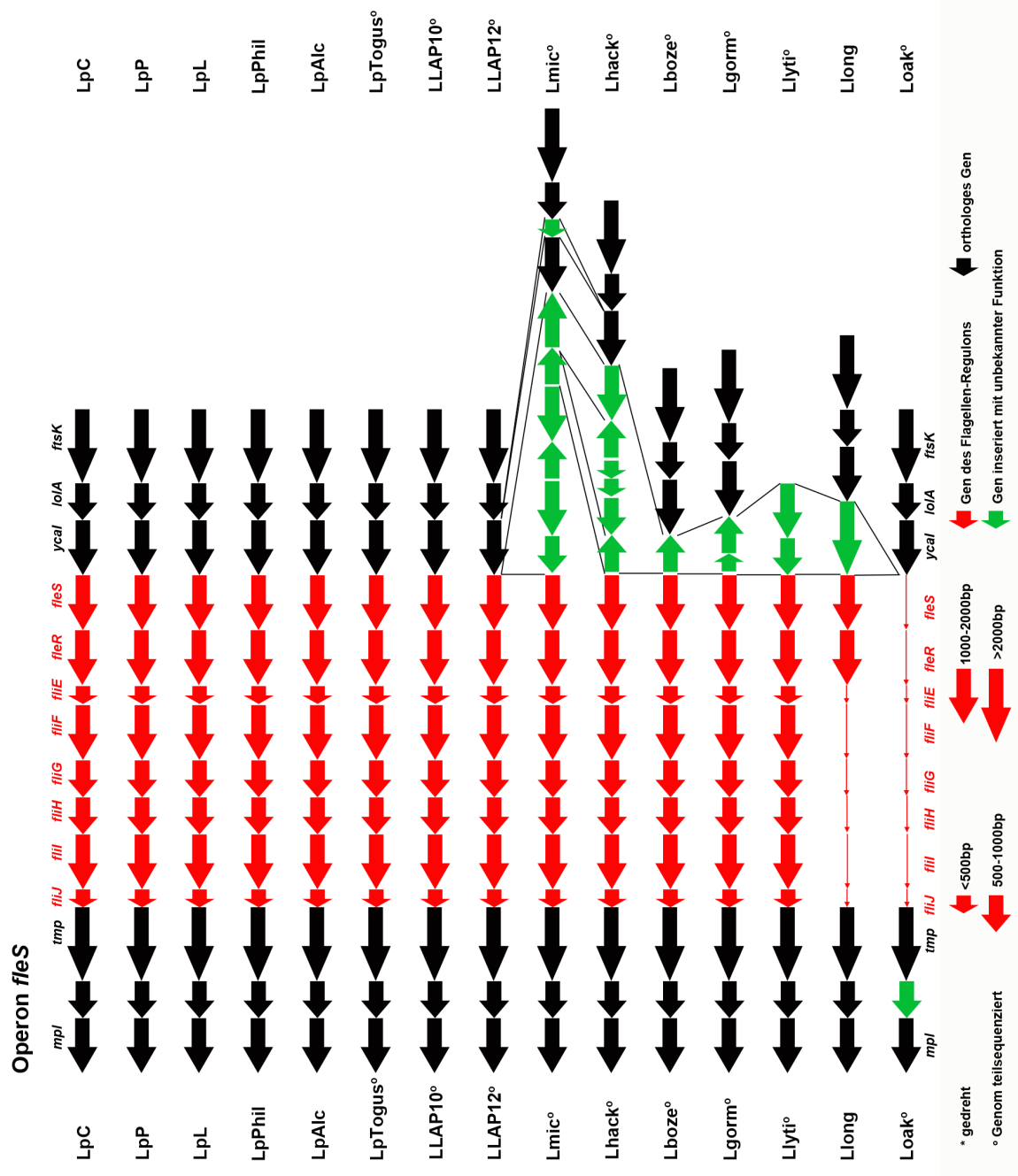


Abb. 48: *In silico* Analyse des Flagellen-Regulons. Teil 3. Operon *fleS*. Für Stammbezeichnungen siehe Tab. 5 und Kapitel 4.5.2.

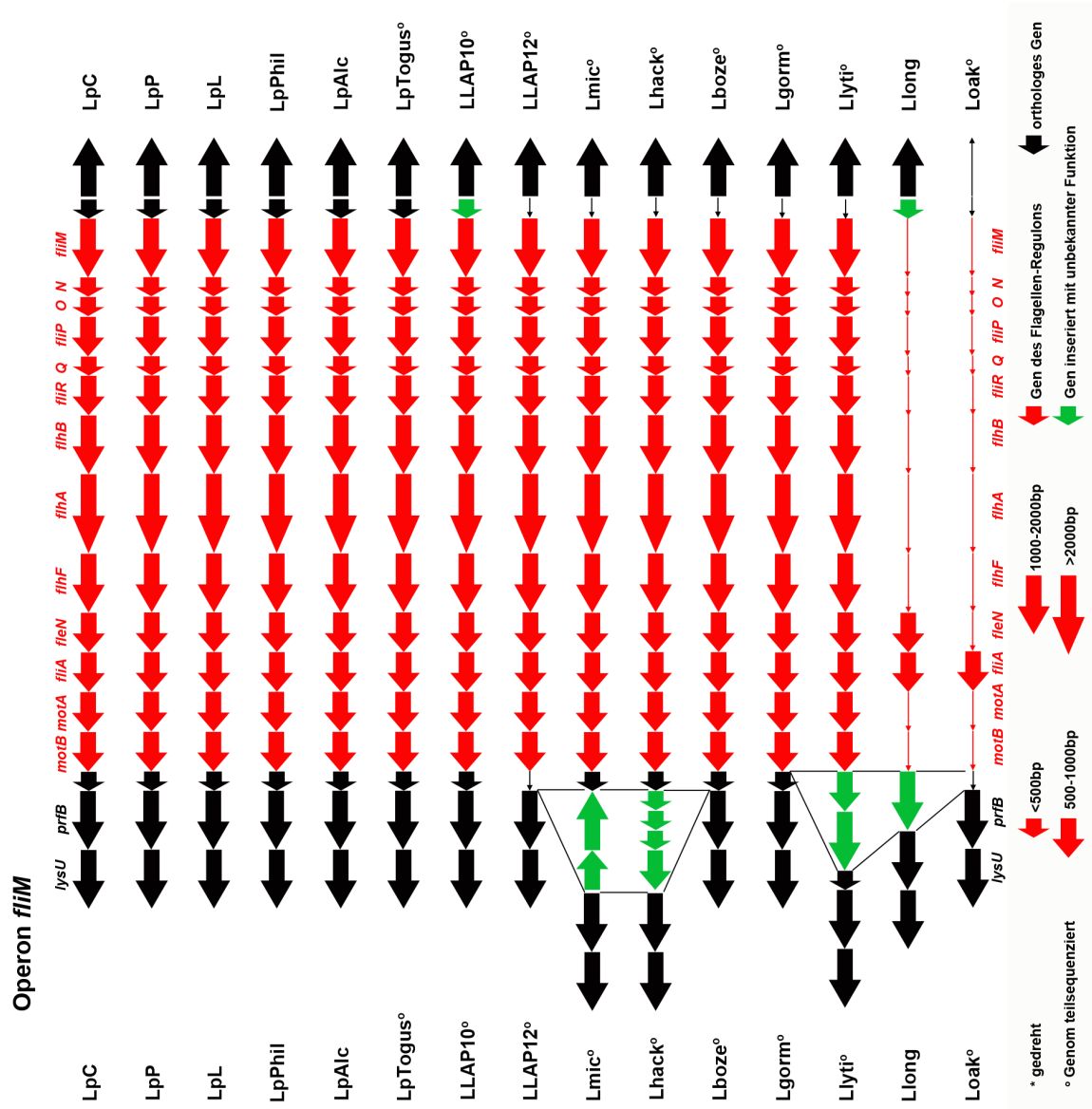


Abb. 49: *In silico* Analyse des Flagellen-Regulons. Teil 4. Operon *fliM*. Für Stammbezeichnungen siehe Tab. 5 und Kapitel 4.5.2.

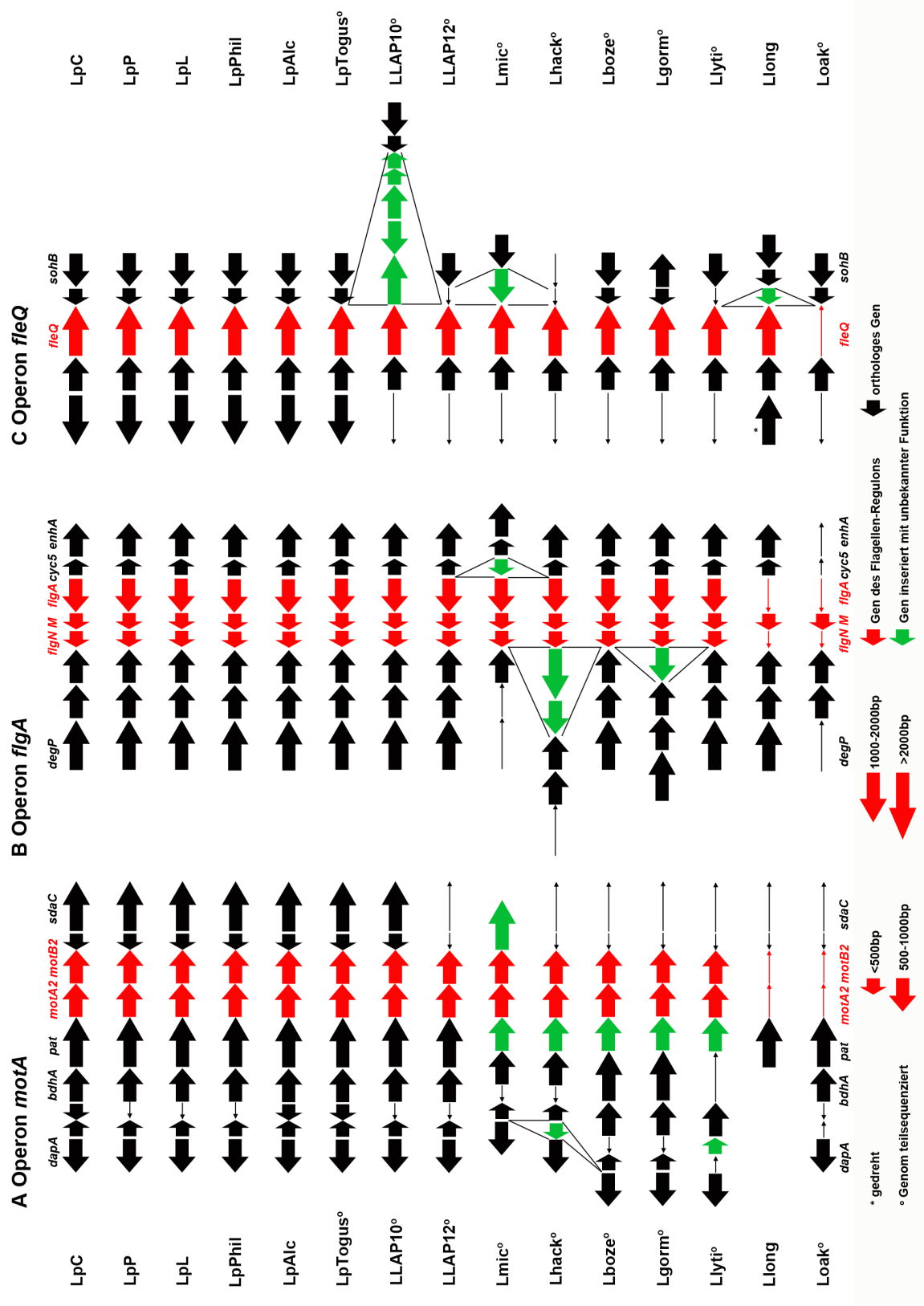


Abb. 50: *In silico* Analyse des Flagellen-Regulons. Teil 5. (A) Operon *motA*. (B) Operon *flgA*. (C) Operon *fleQ*. Für Stammbezeichnungen siehe Tab. 5 und Kapitel 4.5.2.

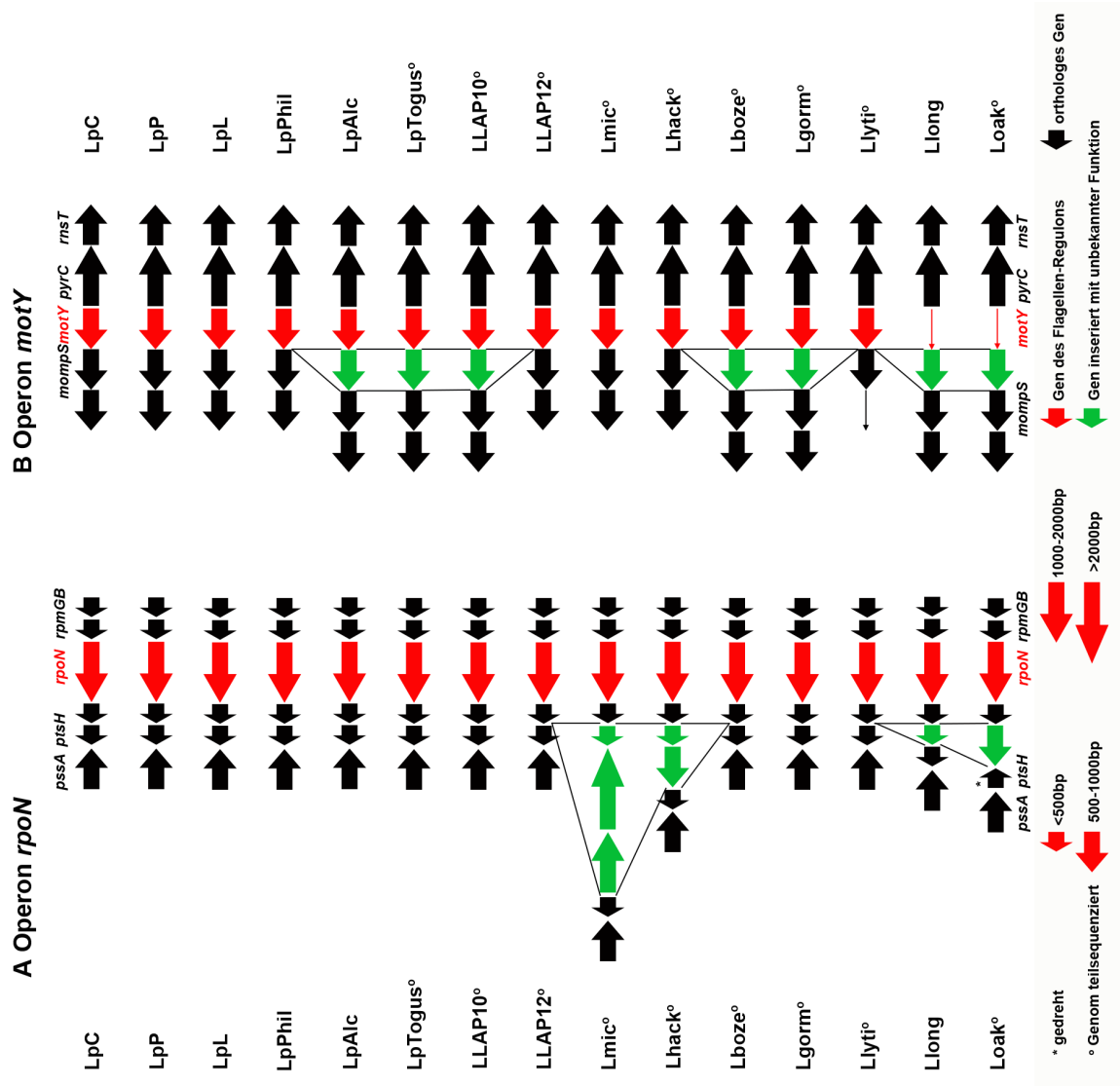


Abb. 51: *In silico* Analyse des Flagellen-Regulons. Teil 6. (A) Operon *rpoN*. (B) Operon *motY*. Für Stammbezeichnungen siehe Tab. 5 und Kapitel 4.5.2.

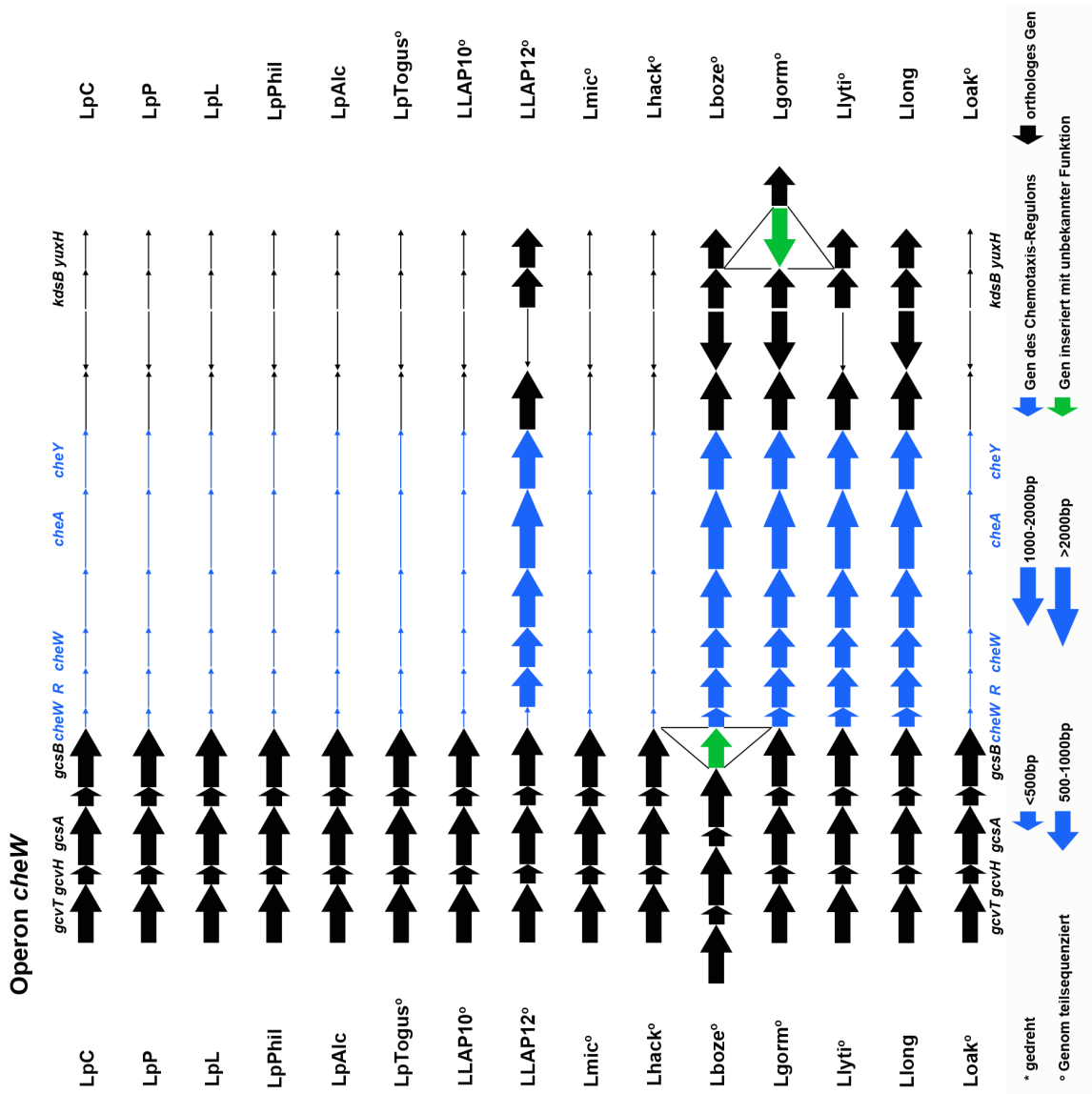


Abb. 52: *In silico* Analyse des Chemotaxis-Operons. Operon *cheW*. Für Stammbezeichnungen siehe Tab. 5 und Kapitel 4.5.2.

4.5.2.1 *Legionella pneumophila* Corby als Referenzstamm

Der Referenzstamm *Lp* Corby besitzt ein vollständiges Flagellensystem inklusive Basalkörper, *Hook* und Filament. Weiterhin sind alle wichtigen Regulatorproteine zur Ausbildung des Flagellenapparates vorhanden. Dazu zählen die in dieser Arbeit untersuchten regulatorischen Proteine RpoN, FleQ, FleR, FleS und FliA (siehe Kapitel 4.3).

Die Gene der Flagellenkaskade werden im Allgemeinen in 4 Klassen eingeteilt (McCarter 2006; Albert-Weissenberger et al. 2010). Das Gen *fleQ*, welches für das *enhancer binding protein* FleQ kodiert, ist der Hauptregulator des Flagellenregulons. Die Expression von *fleQ* als Klasse I Gen wird wahrscheinlich durch den σ^{70} Faktor (RpoD) kontrolliert. Zusammen mit dem σ^{54} Faktor (RpoN) wird die Transkription der Klasse II Gene aktiviert (Jacobi et al. 2004), welche für Proteine des Basalkörpers und des *Hooks* kodieren. Anschließend erfolgt über FleQ die Expression der Klasse III Gene, welche für Motorproteine der Flagelle kodieren. Das Klasse III bzw. eigenständige Gen *fliA* aktiviert schließlich die Expression der Proteine des Filaments (siehe Kapitel 1.10.3).

Das Flagellensystem von *Legionella* ist in 11 Operone aufgeteilt, die über das gesamte Genom verteilt sind. Benannt wurden die verschiedenen Operone jeweils nach dem ersten Gen des Genclusters. Das Operon *fliK2* enthält die Gene *fliK2* und *flhB2*, einem Klasse II bzw. Klasse III Gen (Abb. 46A). Das nächste Operon innerhalb des Genoms enthält ausschließlich die Klasse II Gene *flgB*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K* und *L* und wird als *flgB* Operon bezeichnet (Abb. 46B). Im Weiteren folgen die Operone *flaA* mit den Klasse IV Genen *flaA*, *flaG*, *fliD* und *fliS* und das Operon *fliK*, welches nur das Klasse II Gen *fliK* enthält (Abb. 47A bzw. B). Das *fleS* Operon enthält die Gene *fleS*, *R*, *fliE*, *F*, *G*, *H*, *I* und *J*. Diese Gene werden der Klasse II zugeordnet (Abb. 48). Das Operon *fliM* wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kapitel 4.3.6 bereits näher betrachtet. Es enthält Gene, die der Klasse II (*fliM*, *N*, *O*, *P*, *Q*, *R*, *flhB*, *A*, *F* und *fleN*) und der Klasse III (*fliA*, *motA* und *motB*) zugeordnet werden (Abb. 49). Es folgen die Operone *motA* (Klasse III: *motA2* und *motB2*), *flgA* (Klasse II: *flgA*; Klasse III: *flgM* und *flgN*) und *fleQ* (Klasse I: *fleQ*) (Abb. 50A, B, C). Das Operon mit dem Gen *rpoN* zählt im Grunde genommen nicht zu dem Flagellenregulon (Abb. 51A). Aufgrund seiner zentralen Bedeutung für den Lebenszyklus von *Legionella* und für die Ausbildung der Flagelle wurde es in die Betrachtung mit aufgenommen. Das letzte Flagellen-assoziierte Operon enthält nur das Gen *motY*, welches zur Klasse IV gehört (Abb. 51B).

Durch all diese Gene, die daraus entstehenden Proteine und dem korrekten zeitlichen Ablauf der Expressionskaskade kann in *L. pneumophila* Corby eine funktionelle Flagelle gebildet werden. Ein chemotaktisches System konnte für diesen Stamm nicht nachgewiesen werden.

4.5.2.2 *Legionella longbeachae* NSW150 – ein Chemotaxissystem ohne Flagelle

Als das Genom des Stammes *L. longbeachae* NSW150 (Serogruppe 1) vollständig sequenziert wurde, konnte nicht nur zum ersten Mal ein non-*pneumophila* Stamm auf genomischer Ebene untersucht, sondern auch erstmals ein Chemotaxissystem für *Legionella* nachgewiesen werden (Cazalet et al. 2010). Das Interessante an diesem Stamm war nicht nur dieses System, sondern auch das vollständige Fehlen einer Flagelle. Die Studie von Cazalet und Kollegen zeigte zwar das Vorkommen der Gene *flgD* aus dem *flgB* Operon (Abb. 46B), *fleR* und *fleS* aus dem *fleS* Operon (Abb. 48) und *fleN* und *fliA* aus dem *fliM* Operon (Abb. 49), aber ein Großteil der Struktur- und Motorproteine des Flagellensystems wurde nicht gefunden. Mit den Genen *fleR*, *fleS* und *fliA* konnten nur noch einige der Regulatoren nachgewiesen werden.

Eigene *in silico* Analysen zeigten außerdem das Vorkommen der Gene *fleQ* und *rpoN* (Abb. 50C bzw. Abb. 51A). Weiterhin wurde aus dem *flgA* Operon das Gen *flgM* gefunden, während die daran angrenzenden Gene *flgA* und *flgN* nicht nachzuweisen waren. Die flankierenden genomische Bereiche dieses Operons waren wiederum zum Referenzstamm *Lp* Corby ähnlich (Abb. 50B). Bei Analysen der flankierenden Sequenzen konnten in allen untersuchten Operonen zu *Lp* Corby homologe Bereiche gefunden werden. Es fehlten allerdings bis auf die genannten Gene die Sequenzen der Flagellen-assoziierten Gene. Auch konnten keine unbekannten Bereiche zwischen den flankierenden Sequenzen identifiziert werden. Dieser Teil der genomischen Sequenz fehlte vollständig (Abb. 46 bis Abb. 51).

Das in *L. longbeachae* nachgewiesene putative Chemotaxissystem ist in Abb. 52 dargestellt. Im Allgemeinen dient ein solches System Bakterien dazu bevorzugte Umweltbedingungen zu finden, um sich dann in Richtung der detektierten Lockstoffe zu bewegen. Für *L. longbeachae* konnte Chemotaxis aufgrund der fehlenden Flagelle experimentell nicht gezeigt werden. Es wurde aber gezeigt, dass *L. longbeachae* NSW150 die Gene *cheR*, *cheA*, *cheY* und zwei Homologe zu *cheW* besitzt. Die flankierenden genomischen Bereiche sind dabei zwischen *L. pneumophila* und *L. longbeachae* hoch konserviert. Es wurde

vermutet, dass *L. pneumophila* das Chemotaxissystem trotz Flagellensystem in der Evolution verloren hat (Cazalet et al. 2010). In den weiteren Analysen wurde das Chemotaxissystem von *L. longbeachae* NSW150 als Referenz für die *in silico* Untersuchungen benutzt.

Upstream des chemotaktischen Systems liegen Gene, welche große Ähnlichkeiten zu Genen des Glycin-Stoffwechselsystems (*glycine cleavage system*) von *E. coli* haben (Stauffer and Stauffer 2005). Inwieweit die räumliche Nähe dieser Gene zum Chemotaxissystem eine Rolle für deren Funktion spielt ist nicht bekannt.

4.5.2.3 Weitere *L. pneumophila* Stämme

Zu den bereits bekannten, vollständig sequenzierten Genomen gehören die *L. pneumophila* Stämme Paris, Lens, Philadelphia I und Alcoy. Alle Stämme sind isolierte Ausbruchsstämme. Die stamm-spezifischen Bezeichnungen wurden jeweils entsprechend der Ausbruchsorte verwendet. Die Stämme Paris und Lens wurden in Frankreich isoliert (Cazalet et al. 2004), Alcoy in Spanien (Fernandez et al. 2002), Philadelphia in den USA (Fraser et al. 1977) und der bereits bekannte Corby in England (Jepras et al. 1985).

Die *L. pneumophila* Stämme zeigten untereinander sehr große Ähnlichkeiten. Alle besitzen ein vollständiges Flagellensystem mit den entsprechenden Genen (Abb. 46 bis Abb. 51). Auch die flankierenden Bereiche waren in allen untersuchten Stämmen sehr ähnlich. Kleinere Unterschiede zeigten sich nur im Operon *fliK2* (Abb. 46A) bei *Lp* Philadelphia I, im Operon *fliK* (Abb. 47B) bei *Lp* Paris und *Lp* Lens und im Operon *motA* (Abb. 50A) bei den Stämmen *Lp* Paris, *Lp* Lens und *Lp* Philadelphia I. In diesen Fällen fehlte jeweils ein Gen im Bereich der flankierenden Sequenzen. Diese Gene sind bisher nicht näher charakterisiert. Bei *Lp* Alcoy kam es im Operon *motY* innerhalb der Flanken zu einer Insertion eines Gens (Abb. 51B). Interessanterweise handelte es sich dabei um eine Genduplikation des Gens *mompS*.

In keinem der Stämme konnten die Gene für ein putatives Chemotaxissystem nachgewiesen werden (Abb. 52). Die bei *L. longbeachae* *upstream* des Systems liegenden Gene des Glycin-Stoffwechselsystems waren auch in den *L. pneumophila* Stämmen nachzuweisen. Die daran anschließenden Sequenzen des Chemotaxissystems und die direkt *downstream* liegenden Bereiche wurden in diesen Stämmen nicht gefunden.

4.5.2.4 *Legionella pneumophila* Togus-1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit *L. pneumophila* Togus-1 erstmals ein *Legionella pneumophila* Stamm der Serogruppe 2 auf Genomebene sequenziert und untersucht. Diese Serogruppe macht nur einen sehr geringen Teil (0,4 %) aller *Legionella*-Infektionen aus. Im Vergleich dazu hat die Serogruppe 1 mit 84,2 % Anteil an humanen Infektionen (Yu et al. 2002). Interessanterweise wurde gezeigt, dass sich dieser Stamm in den primären Knochenmarksmakrophagen der Mauslinien C57BL/6 und A/J vermehren kann (Miyamoto et al. 1996). Die Mäuse der Linie C57BL/6 sind dabei der wildtypische Stamm, während A/J Mäuse eine Mutation in der Sequenz des zytosolischen Rezeptors Naip5 tragen (Wright et al. 2003). Dieser sorgt für eine Erkennung des bakteriellen Flagellins und für die Aktivierung der Immunreaktion der Wirtszelle (siehe Kapitel 1.10.5) (Vinzing et al. 2008). Ohne diesen Rezeptor können sich flagellierte Legionellen in A/J Mausmakrophagen stärker replizieren. Andererseits können sich Bakterien ohne Flagellin auch in wildtypischen Makrophagen vermehren.

Entgegen den Erwartungen besitzt *Lp* Togus-1 ein vollständiges Flagellenregulon (Abb. 46 bis Abb. 51). Alle Flagellen-assoziierten Gene und das Flagellin (*flaA*) selbst konnten nachgewiesen werden. Auch waren alle Operone in denselben genomischen Bereichen lokalisiert. Nur in den flankierenden Bereichen des *fliK2* Operons fehlte ein Gen unbekannter Funktion. Auch in diesem Stamm kam es im Operon *motY* zu einer Genduplikation des Gens *mompS* (Abb. 51B).

Ein genauer Sequenzabgleich des Flagellins von *Lp* Togus-1 zeigte sehr große Ähnlichkeiten zu *L. pneumophila* Corby. Auf DNA-Ebene betrug die Identität 97 % (1382 von 1429 bp) und auf Protein-Ebene sogar 99 % (469 von 475 Aa). Alle Unterschiede befanden sich in der vorderen Hälfte der Sequenz. Eine zuvor beschriebene Leucin-reiche Region am C-Terminus des Flagellins, welche für die Erkennung durch den wirtseigenen, zytosolischen Rezeptor IPAF wichtig ist, wurde ebenfalls gefunden (Lightfield et al. 2008).

Ein Chemotaxisssystem wurde in *Lp* Togus-1 nicht nachgewiesen. Der *upstream* davon liegende Bereich konnte auch in diesem Stamm gefunden werden, während der direkt *downstream* liegende Bereich nicht detektiert werden konnte (Abb. 52).

4.5.2.5 *Legionella-like amoebal pathogen 10* - LLAP10 – *Legionella fallonii*

Der Stamm LLAP10 (*Legionella-like amoebal pathogen 10*) ist eine Subspezies von *L. fallonii* und wurde erstmals 1996 beschrieben (Birtles et al. 1996). Gefunden wurde der Stamm bei Untersuchungen der 16S rRNA in verschiedenen *Legionella*-Spezies. Teilsequenzen des Genoms wurden von Prof. Carmen Buchrieser (Institut Pasteur, Paris) bereitgestellt.

Die vorliegenden *in silico* Analysen konnten zeigen, dass dieser Stamm ein Flagellensystem besitzt, welches homologe Gene zum Referenzstamm *Lp* Corby hat (Abb. 46 bis Abb. 51). Auch die angrenzenden genomischen Regionen waren der Referenz bis auf kleine Unterschiede ähnlich. So zeigte zum Beispiel das *fliK2* Operon direkt angrenzend an die Flagellengene jeweils die Deletion eines Gens (Abb. 46A). Weiterhin ist das *flgB* Operon zu nennen, bei dem *downstream* der Gene des Flagellenregulons der gesamte untersuchte genomische Bereich deletiert war (Abb. 46B). Die Operone *fliM* und *fleQ* zeigten Insertionen in der Nähe der Flagellengene (Abb. 49 und Abb. 50C). Bei letzterem war sogar eine Insertion von 5 offenen Leserahmen nachzuweisen. Da all diese Gene keine bekannte Funktion hatten, konnten keine weiteren Informationen zur Bedeutung der Deletion gesammelt werden. Auch der Stamm LLAP10 hatte eine Genduplikation des Gens *mompS* (Abb. 51B). Dies ist anscheinend unter den verschiedenen *Legionella*-Spezies ein sehr weit verbreitetes Phänomen.

Wie in den *L. pneumophila* Stämmen konnte auch in LLAP10 kein Chemotaxissystem gefunden werden. Der gesamte genomische Bereich war dem Referenzstamm ähnlich (Abb. 52).

4.5.2.6 *Legionella-like amoebal pathogen 12* - LLAP12 - *Legionella drancourtii*

LLAP12 wurde erstmals in Ko-Kultur mit *Acanthamoeba* beschrieben und wurde bei Untersuchungen zu einem Ausbruch von Pontiac-Fieber in Schottland gefunden (Fallon and Rowbotham 1990). Später wurde dieser Stamm zu *L. drancourtii* umbenannt und beschrieben als strikt intrazellulär lebendes Bakterium, welches *Acanthamoeba polyphaga* infiziert (La Scola et al. 2004). Die Gruppe um Moliner et al. veröffentlichte 2009 Teilsequenzen des Genoms (www.pubmed.org). Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit in Bezug auf das Flagellenregulon ausgewertet.

L. drancourtii besitzt kein vollständiges Flagellenregulon. Die Untersuchungen zeigten, dass die Gene *fliK2*, *flhB2* und *fliK* fehlen (Abb. 46 bis Abb. 51). FliK und FlhB wurden bereits in Salmonellen und Yersinien als Regulatoren für die Länge des *Hooks* beschrieben (Hirano et al. 1994; Shibata et al. 2007). Diese Funktionen sind wichtig für die Funktionalität der Flagelle. Allerdings konnten in dieser Arbeit die Sequenzen der wichtigsten regulatorischen Proteine RpoN, FleQ, FleR, FleS und FliA nachgewiesen werden. Das Vorkommen aller Motorproteine sowie des Flagellings machen das Ausbilden einer intakten Flagelle möglich.

Außerdem konnte für diesen Stamm ein putatives Chemotaxissystem gezeigt werden. Dieses besitzt große Ähnlichkeiten zu *L. longbeachae*. Bis auf eines der beiden *cheW* Homologe waren alle Gene vorhanden. Auch der flankierende genomische Bereich zeigte viele Gemeinsamkeiten. Ein Gen mit unbekannter Funktion war in diesem Stamm deletiert (Abb. 52).

Somit konnte erstmals das gemeinsame Vorkommen von Flagellen- und Chemotaxissystem gezeigt werden. Weiterführende Studien müssen mit einer biologischen Probe durchgeführt werden.

4.5.2.7 *Legionella micdadei*

L. micdadei wurde 1979 entdeckt und zunächst als Auslöser der Pittsburgh-Pneumonie isoliert (Brenner et al. 1979; Donegan et al. 1981; Doebbeling et al. 1989). Später wurde der Stamm der Spezies *Legionella* zugeordnet (Garrity et al. 1980) und seitdem immer wieder als Patienten- und Umweltisolat gefunden (Medarov et al. 2004; Furuhashi et al. 2009).

Die *in silico* Analysen zeigten für *L. micdadei* ein vollständiges Flagellensystem mit allen Genen des Referenzstammes (Abb. 46 bis Abb. 51). Die genomischen Regionen in denen die Flagellengene liegen, waren ebenfalls dieselben wie in *Lp* Corby. Allerdings konnten dabei auch größere Abweichungen gefunden werden. Die Operone *fliK2*, *flaA*, *fleS*, *fliM*, *motA*, *flgA*, *fleQ* und *rpoN* zeigen zum Teil sehr große inserierte Bereiche mit Genen unbekannter Funktion. So waren zum Beispiel im Operon *fleS* sechs, zum Teil sehr große, offene Leseraster zwischen den Genen der Flagelle und den flankierenden Bereichen zu finden (Abb. 48). Auch konnten in diesen Bereichen Deletionen von Genen detektiert werden.

Zu nennen sind dabei die Operone *fliK2*, *flgB*, *flaA*, *fliK*, *fliM*, *motA*, *flgA* und *fleQ*. Es waren meist nur 1-2 Gene deletiert.

Ein Chemotaxisssystem wurde nicht nachgewiesen, jedoch waren die angrenzenden Bereiche denen der *L. pneumophila* Stämme sehr ähnlich (Abb. 52). Dies steht im Gegensatz zu den flankierenden Bereichen der untersuchten Flagellenoperone, welche sich stark von den *L. pneumophila* Stämmen unterscheiden (Abb. 46B, Abb. 47B, Abb. 48, Abb. 49, Abb. 50 und Abb. 51A).

4.5.2.8 *Legionella hackelia*

Auch *L. hackelia* wurde kurz nach dem ersten großen Ausbruch der Legionärskrankheit und der Entdeckung der Legionellen erstmals beschrieben (Brenner et al. 1979). Inzwischen sind zwei verschiedene Serogruppen dieses Stammes beschrieben (Wilkinson et al. 1985). Sowohl die Serogruppe 1 als auch die Serogruppe 2 sind humanpathogen und können eine schwere Pneumonie auslösen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Serogruppe 2 genotypisch näher untersucht.

Anhand der *in silico* Analysen wurde in *L. hackelia* ein nahezu vollständiges Flagellensystem nachgewiesen (Abb. 46 bis Abb. 51). Nur das Gen *fliK* konnte nicht gefunden werden (Abb. 47B). Auch konnten hierbei die flankierenden Bereiche nur teilweise nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde innerhalb des *flaA* Operons zwischen den Genen *fliD* und *fliS* ein neuer offener Leserahmen entdeckt (Abb. 47A). Zur möglichen Funktion dieses Gens konnten aufgrund der unbekannten Sequenz keine weiteren Aussagen getroffen werden. In beinahe jedem der flankierenden Bereiche wurden Insertionen oder Deletionen der benachbarten Gene gefunden. Besonders zu erwähnen ist dabei das *fleS* Operon. Hier waren *upstream* der Flagellengene insgesamt sechs unbekannte Gene inseriert (Abb. 48). Zwei Gene waren den Genen aus dem Stamm *L. micdadei* im selben Operon ähnlich. In beiden Stämmen ist die Anordnung der Gene des flankierenden Bereichs aber unterschiedlich. Auch das *fliM* Operon zeigte in beiden Stämmen im *downstream* Bereich ein ähnliches Muster. So konnten bei *L. hackelia* vier unbekannte offene Leserahmen nachgewiesen werden, während am derselben Stelle bei *L. micdadei* zwei Leserahmen inseriert waren (Abb. 49).

In *L. hackelia* wurde kein putatives Chemotaxisssystem nachgewiesen. Die benachbarten Gene des Glycin-Stoffwechsels konnten aber gefunden werden (Abb. 52).

4.5.2.9 *Legionella bozemanii*

L. bozemanii wurde 1980 isoliert (Brenner 1980) und *Legionella* zugeordnet (Garrity et al. 1980; Hebert et al. 1980). Ein paar Jahre später wurde nach der Serogruppe 1 auch die Serogruppe 2 identifiziert (Tang et al. 1984). Immer wieder war dieser Stamm verantwortlich für vereinzelte Todesfälle, konnte aber auch in Bodenproben häufig nachgewiesen werden (Widmer et al. 2007; Casati et al. 2010).

Untersuchungen des Flagellenoperons zeigten alle assoziierten Operone bis auf das *fliK2* Operon (Abb. 46 bis Abb. 51). Dieses fehlt vollständig, nur 2 Gene des flankierenden Bereichs konnten gefunden werden (Abb. 46A). Auch in diesem Stamm konnten teilweise große Veränderungen in den Nachbarregionen gezeigt werden. So kam es zu Deletionen in den Operonen *flgB*, *fliK*, *fliM*, *motA* und *fleQ*. Auch Insertionen konnten gefunden werden. So wurde wie auch schon in den Stämmen *L. micdadei* und *L. hackelia upstream* des *motA* Operons dasselbe Gen mit unbekannter Funktion gefunden (Abb. 50). Weiterhin ist zu erwähnen, dass es wie schon in den Stämmen *Lp Alc*, *Lp Togus-1* und *LLAP10* zu einer Duplikation des Gens *mompS* im Operon *motY* gekommen ist (Abb. 51B).

Eine weitere Besonderheit des Stammes *L. bozemanii* ist das Vorkommen eines Chemotaxisoperons (Abb. 52). Es wurden dieselben Gene wie im Referenzstamm *L. longbeachae* gefunden. Auch die Nachbarregionen waren ähnlich mit der Ausnahme einer Geninsertion zwischen den Genen *gcsB* und *cheW*. Eine Funktion konnte diesem Gen allerdings nicht zugeordnet werden.

4.5.2.10 *Legionella gormanii*

L. gormanii wurde zunächst der Spezies *Fluoribacter* zugeordnet und erst später zu *Legionella* (Morris et al. 1980; Brown et al. 1981). Wie bei den anderen Stämmen kommt es zu sporadischen Infektionen des Menschen, allerdings wird *L. gormanii* auch oft in Bodenproben nachgewiesen (Griffith et al. 1988; Casati et al. 2010).

In silico Untersuchungen konnten den größten Teil der Flagellen-assoziierten Gene nachweisen (Abb. 46 bis Abb. 51). Nicht zu finden war auch hier wieder das *fliK2* Operon mit den Genen *fliK2* und *flhB2* (Abb. 46A). Im Weiteren sind eine erneute Genduplikation des Gens *mompS* und das Fehlen einiger Gene der flankierenden Sequenzen zu erwähnen.

Der Stamm *L. gormanii* trägt ein vollständiges Chemotaxisoperon ähnlich zu *L. longbeachae* (Abb. 52). Sowohl die entsprechenden Gene als auch diese angrenzenden Regionen waren nachweisbar. Im Bereich *downstream* des Systems wurde eine Insertion eines relativ großen Leserahmens gefunden.

4.5.2.11 *Legionella lytica*

L. lytica wurde zunächst als *Sarcobium lytica* bezeichnet und später der *Legionella* Spezies zugeordnet (Springer et al. 1992; Palusinska-Szyszl et al. 2001). Der Stamm zeichnet sich durch eine besondere Membranzusammensetzung aus. So tragen zum Beispiel die Phospholipide von *L. lytica* anders als bei *L. pneumophila* unverzweigte Ketten (Palusinska-Szyszl et al. 2008).

L. lytica besitzt kein vollständiges Flagellensystem. Es fehlen die Operone *fliK* und *fliK2*. Weiterhin sind *upstream* des *fleS* Operons zwei relativ großen Genen inseriert (Abb. 48). Auch hinter dem Gen *motB* aus dem Operon *fliM* waren zwei große unbekannte Gene nachzuweisen (Abb. 49).

Auch *L. lytica* trägt das putative Chemotaxisoperon mit allen Genen und den benachbarten Bereichen (Abb. 52). Nur *downstream* des Operons fehlt ein relativ großes Gen unbekannter Funktion.

4.5.2.12 *Legionella oakridgensis*

L. oakridgensis wurde 1983 erstmals beschrieben (Orrison et al. 1983) und konnte später auch in Patientenisolaten und in Bodenproben nachgewiesen werden (Lo Presti et al. 2000; Casati et al. 2010).

Neben *L. longbeachae* ist *L. oakridgensis* der zweite *Legionella* Stamm ohne Flagellensystem. *In silico* Untersuchungen konnten das Fehlen der Flagellen-assoziierten Gene zeigen (Abb. 46 bis Abb. 51). Nur die Gene *rpoN* (σ^{54}), *fliA* (σ^{28}) und *flgM* als anti- σ^{28}

Faktor waren vorhanden, wobei *rpoN* nicht direkt zum Flagellenregulon gehört (Abb. 49 bzw. Abb. 51A). Anders als bei *L. longbeachae* fehlen alle anderen Gene. Die konservierten flankierenden Bereiche waren in allen Operonen nachweisbar. Der dazwischen liegende Bereich fehlte vollständig. Erneut konnte eine Genduplikation von *mompS* gezeigt werden (Abb. 51B).

Im Gegensatz zu *L. longbeachae* besitzt *L. oakridgensis* kein Chemotaxissystem. Die dazugehörigen Gene wurden nicht gefunden. Die Gene des Glycin-Stoffwechsels wurden in den flankierenden Bereichen gefunden (Abb. 52).

Somit ist *L. oakridgensis* der erste *Legionella* Stamm, der weder ein Flagellensystem noch ein Chemotaxissystem besitzt. Lediglich *fliA* und *flgM* waren nachzuweisen. Dies lässt auf eine besondere Rolle dieses Regulators FliA mit seinem anti- σ Faktor FlgM außerhalb des Flagellensystems schließen. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere *in silico* Analysen im Bezug auf *fliA* durchgeführt (Kapitel 4.5.4.4 und 4.3.8.5).

Im Weiteren konnte für diesen Stamm ein Plasmid mit einer Größe von 50.244 bp nachgewiesen werden. Dieses trägt unter anderem ein *tra*-System und verschiedene Gene für putative Metallionen-Resistenzen.

4.5.2.13 Genomweite Unterschiede zwischen den Stämmen

Nachdem die Eigenschaften der einzelnen Stämme im Bezug auf das Vorkommen und den Aufbau des Flagellen- bzw. des Chemotaxissystems näher untersucht wurden, sollten Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Stämmen betrachtet werden. Dazu wurden die Operone als Gesamtheit betrachtet. Es konnte festgestellt werden, dass einige Operone Spezies-spezifisch vorkommen. Das Operon *fliK2* konnte in allen *L. pneumophila* Stämmen nachgewiesen werden, während das Operon in non-*pneumophila* Stämmen häufig fehlt (Abb. 46A). Die flankierenden Bereiche zeigten oft große homologe Bereiche zwischen den Stämmen, aber es gab auch einige Bereiche, die sich sehr stark unterschieden. Zu nennen sind hier die *downstream* Bereiche des *flgB* Operons, des *flaA* Operons und des *fliM* Operons (Abb. 46B, Abb. 47A bzw. Abb. 49). Weiterhin war der *upstream* Bereich des *fleS* Operons sehr divers. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der *pneumophila* Stämme gab es dort weniger Unterschiede als zwischen den anderen Stämmen. Auffällig war auch das Fehlen einiger Gene der benachbarten Regionen. Zum Beispiel das Gen *upstream* des *fliM* Operons

oder das relativ große Gen im *upstream* Bereich von *fleQ* (Abb. 49 bzw. Abb. 50C). Besonders interessant ist die Genduplikation von *mompS* im Operon *motY*. In sieben Stämmen konnte dieses Muster gezeigt werden, sowohl in *L. pneumophila* als auch in non-*pneumophila* Stämmen (Abb. 51B). Dies ist ein gutes Beispiel dafür, dass diese Duplikation separat in mehreren entfernt verwandten Arten stattgefunden hat. Dies könnte an der Funktion von *mompS* als Vorläuferprotein des Virulenzproteins *major outer membrane proteins* (Momp) liegen (Krinos et al. 1999).

4.5.3 Phänotypische Untersuchung verschiedener *Legionella* Stämme mittels Elektronenmikroskopie

Es konnte bereits gezeigt werden, dass viele der *in silico* untersuchten *Legionella* Stämme die genomischen Voraussetzungen für einen vollständigen Flagellenapparat besitzen. Die Stämme *L. longbeachae* und *L. oakridgensis* besitzen kein komplettes Flagellenregulon, sondern nur noch einige regulatorische Proteine wie zum Beispiel FliA (Abb. 49). Aber auch in den anderen *Legionella* Stämmen fehlten einige der Flagellen-assoziierten Gene. Relativ häufig fehlten beispielsweise die Operone *fliK* und *fliK2* (Abb. 46B bzw. Abb. 47A). Wie bereits erwähnt wurde FliK in Salmonellen und Yersinien als Regulator der Länge des *Hooks* beschrieben (Hirano et al. 1994; Shibata et al. 2007). Inwieweit dieses Fehlen Auswirkungen auf die Ausbildung und den Phänotyp der Flagelle der Legionellen hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit mikroskopisch überprüft.

Dazu wurden die Bakterien in YEB-Medium angezüchtet und für die Elektronenmikroskopie präpariert. Schließlich wurden Übersichtsbilder von den Legionellen erstellt (Abb. 53).

In den verschiedenen zur Verfügung stehenden *L. pneumophila* Stämmen Corby, Paris, Philadelphia I und Togus-1 konnten erwartungsgemäß polare Flagellen gezeigt werden (Abb. 53A-D). Eine biologische Probe der Stämme *Lp* Lens, *Lp* Alcoy und LLAP12 stand nicht zur Verfügung. Auch die Stämme LLAP10 und *L. micdadei* besitzen ein vollständiges Flagellenregulon und eine Flagelle wurde nachgewiesen (Abb. 53E, F). Im Gegensatz dazu konnten bei den Stämmen ohne Flagellensystem, *L. longbeachae* und *L. oakridgensis*, keine solchen Strukturen gezeigt werden (Abb. 53K, L).

Den Stämmen *L. hackelia*, *L. bozemanii* und *L. gormanii* fehlte jeweils eines der *fliK* Operone. Eine Auswirkung auf die Flagelle oder die Länge des *Hooks* konnte nicht beobachtet werden (Abb. 53G-I). Dem Stamm *L. lytica* fehlten sogar beide der *fliK* Operone. Trotz dieser Umstände besitzt auch dieser Stamm eine Flagelle (Abb. 53J). Dies widerlegt auch Vermutungen, dass die beiden *fliK* Gene ein Fehlen gegenseitig kompensieren können. Im Gegensatz zu anderen *fliK*-defizienten Bakterienstämmen konnte hier ein in der Länge stark veränderter *Hook* nicht beobachtet werden (nicht gezeigt) (Shibata et al. 2007).

Auffällig ist der Stamm *L. drancourtii* (LLAP12). Bei diesem Stamm fehlen die Gene *fliK*, *fliK2*, *flhB2* und *fliO*. FliO als integrales Membranprotein konnte nicht gefunden werden. Eine biologische Probe dieses Stammes stand noch nicht zur Verfügung, sodass die Frage nach dem Vorkommen einer Flagelle vorerst unbeantwortet bleiben muss.

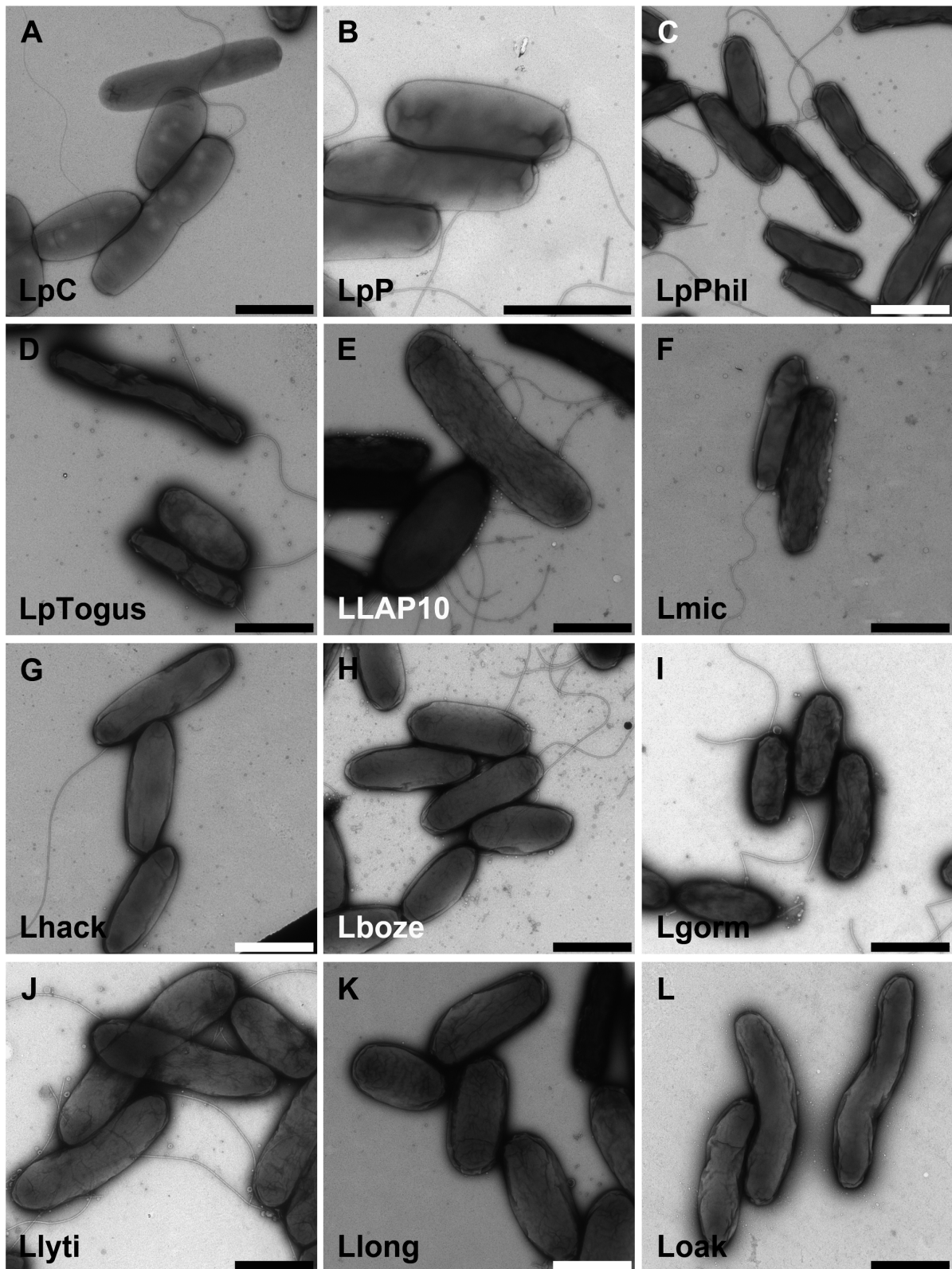


Abb. 53: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Flagellenexpression der verfügbaren, *in silico* untersuchten *Legionella* Stämme. Die Bakterien wurden in YEB-Medium bei 30°C und langsamer Schüttelbewegung für einen Tag angezogen. Durch Negativ-Kontrastierung mit 0,5 % Uranylacetat wurden die Bakterien auf Pioloform-F beschichteten Kupfernetzen gefärbt und mittels TEM 902 analysiert. (A) *L. pneumophila* Corby, LpC ; (B) *L. pneumophila* Paris, LpP; (C) *L. pneumophila* Philadelphia I, LpPhil; (D) *L. pneumophila* Togus-1, LpTogus ; (E) *Legionella-like amoebal pathogen* 10, LLAP10; (F) *L. micdadei*, Lmic ; (G) *L. hackelia*, Lhack ; (H) *L. bozemanii*, Lboze ; (I) *L. gormanii*, Lgorm ; (J) *L. lytica*, Llyti ; (K) *L. longbeachae* NSW150, Llong ; (L) *L. oakridgensis*, Loak. Balken: 1 µm.

4.5.4 Vergleichende Untersuchungen zur Verwandtschaft verschiedener *Legionella* Stämme

Verwandtschaftliche Beziehungen zwischen verschiedenen Arten können über Gemeinsamkeiten in der Genomsequenz der Organismen definiert werden. Dabei werden hochkonservierte Bereiche des Genoms genutzt um sehr geringe Unterschiede zwischen Stämmen zu finden. Diese dienen dann als Anhaltspunkt für solche Verwandtschaftsbeziehungen. Der nachfolgende Teil beschäftigt sich mit diesem Thema um mögliche Ursachen für die gezeigten Unterschiede im Flagellen- und Chemotaxissystem zu finden. Arten mit denselben Vorfahren müssten zu Beispiel ähnliche Veränderungen in diesen Systemen zeigen. Auch horizontaler Gentransfer und Rekombinationen können eine Rolle bei der Verbreitung und den Veränderungen eines hochkomplexen Systems wie dem der Flagelle oder dem einfacher strukturierten Chemotaxissystem spielen.

Nicht nur für die Bestimmung von verwandtschaftlichen Beziehungen und Gentransfers sind solche Analysen enorm wichtig. Die *European Working Group for Legionella Infections* (EWGLI, <http://www.ewgli.org/>) hat vor ein paar Jahren damit begonnen alle bekannten *Legionella* Spezies anhand der Sequenz-basierten Typisierung (SBT, *Sequence-Based Typing*) einzuordnen. Dies ermöglicht eine schnelle und genaue Klassifizierung von *Legionella* Stämme, welche beispielsweise während eines Ausbruchs oder in der Umwelt gefunden wurden. Zur eindeutigen Bestimmung des Sequenztyps müssen die Sequenzen der sieben Gene *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* und *neuA* vorliegen (Gaia et al. 2005; Ratzow et al. 2007). Anhand der Sequenzen und mit dem Abgleich zu Datenbanken kann man auf wichtige Informationen zum Stamm, dessen Herkunft und mögliche Kontaminationsquellen und -ursachen rückschließen (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php).

In Rahmen dieser Arbeit wurden für die Untersuchungen der Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener *Legionella* Stämme und eines möglichen horizontalen Gentransfers verschiedene Gen- und Proteinsequenzen aus den vorliegenden Genomdaten extrahiert. Diese wurden mit Hilfe des Programms *ClustalW* analysiert. Zur Vereinfachung werden in diesem Kapitel nur die Dendrogramme gezeigt.

4.5.4.1 Flagellen-Regulon

Zu Beginn der Untersuchungen wurden für die Erstellung eines Dendrogramms zunächst die DNA-Sequenzen der Flagellenoperone künstlich zusammengeführt alle Flagellengene in einer gemeinsamen Datei gesammelt. Genomische Bereiche wurden dazu entfernt. Die Sortierung der Operone entspricht dabei dem Vorkommen in *Lp* Corby. Die einzelnen Operone wurde aus Gründen der Übersicht jeweils durch 10 Ns (entspricht Leerzeichen) voneinander getrennt. Das *Alignment* wurde mit Hilfe des Programms *ClustalW* durchgeführt.

Das *Alignment* zeigte deutlich eine sehr nahe Verwandtschaft der verschiedenen *L. pneumophila* Stämme (siehe Abb. 54). Diese bildeten zwei Cluster (blau unterlegt). Dem entgegen standen die anderen untersuchten *Legionella* Spezies. Besonders interessant war die Clusterbildung der Stämme mit putativem Chemotaxisystem (rot unterlegt). Dies lässt darauf schließen, dass diese Arten einen gemeinsamen Ursprung oder Vorfahren haben. Bei der Untersuchung der nicht-flagellierten Stämme *L. longbeachae* und *L. oakridgensis* konnte innerhalb der Gruppe der non-*pneumophila* Stämme keine Clusterbildung beobachtet werden (grün unterlegt). Dadurch kann ein paralleler „Verlust“ des Flagellensystems in diesen Stämmen vermutlich ausgeschlossen werden. Aufgrund der Komplexität und der Größe des Flagellensystems wäre hier eine Gruppenbildung zu erwarten gewesen.

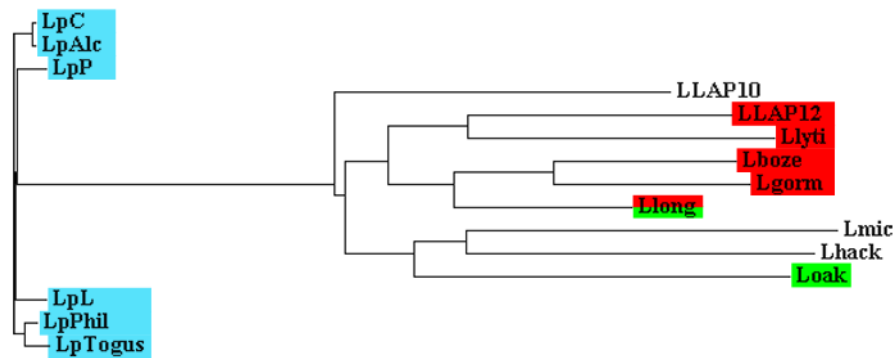


Abb. 54: *In silico* Untersuchung des gesamten Flagellen-Regulons von verschiedenen *Legionella* Stämmen mittels *ClustalW Alignment* auf DNA-Ebene. Die Entfernung vom Ursprung (links) entspricht dem relativen evolutionären Abstand zwischen den Stämmen. Abkürzungen: *L. pneumophila* Corby, LpC; *L. pneumophila* Paris, LpP; *L. pneumophila* Lens, LpL; *L. pneumophila* Philadelphia I, LpPhil; *L. pneumophila* Alcoy, LpAlc; *L. pneumophila* Togus-1, LpTogus; *Legionella-like amoebal pathogen 10* (*L. fallonii*), LLAP10; *Legionella-like amoebal pathogen 12* (*L. drancourtii*), LLAP12; *L. micdadei*, Lmic; *L. hackelia*, Lhack; *L. bozemanii*, Lboze; *L. gormanii*, Lgorm; *L. lytica*, Llyti; *L. longbeachae* NSW150, Llong; *L. oakridgensis*, Loak. Farbschema: Blau, *L. pneumophila* Stämme; Rot, *Legionella* Stämme mit Chemotaxisystem; Grün, *Legionella* Stämme ohne Flagelle.

4.5.4.2 Chemotaxis-Operon

Auch die DNA-Sequenzen des putativen Chemotaxisystems wurden für eine Betrachtung der verwandtschaftlichen Beziehungen herangezogen. Man kann eine relative Ähnlichkeit zwischen diesen Stämmen erkennen (rot unterlegt). Im Weiteren zeigten sich innerhalb dieser Stämme einerseits eine Gruppierung von *L. bozemanii* und *L. gormanii* und andererseits ein Cluster von LLAP12 und *L. lytica*. *L. longbeachae* als aflagellierter Stamm mit Chemotaxisoperon konnte eher dem letzteren Cluster zugeordnet werden, hat aber dort eine gewisse Eigenständigkeit (grün unterlegt). Die beschriebene Clusterbildung der Stämme mit Chemotaxisoperon zeigen große Ähnlichkeiten zu den Clustern des Flagellen-Regulons (Abb. 54). Dadurch kann man eine gemeinsame Entwicklung beider Systeme vermuten.

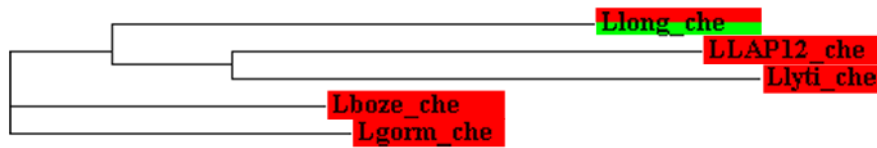


Abb. 55: *In silico* Untersuchung des gesamten Chemotaxis-Operons von verschiedenen *Legionella* Stämmen mittels *ClustalW Alignment*. Die Entfernung vom Ursprung (links) entspricht dem relativen evolutionären Abstand zwischen den Stämmen. Abkürzungen: *Legionella-like amoebal pathogen* 12 (*L. drancourtii*), LLAP12; *L. bozemanii*, Lboze; *L. gormanii*, Lgorm; *L. lytica*, Llyti; *L. longbeachae* NSW150, Llong. Farbschema: Rot, *Legionella* Stämme mit Chemotaxissystem; Grün, *Legionella* Stamm ohne Flagelle.

4.5.4.3 Mip (macrophage infectivity potentiator)

Wie bereits erwähnt wird die Sequenz des *macrophage infectivity potentiator* Mip auch im Rahmen der Sequenz-basierten Typisierung der EWGLI genutzt. In allen bisher gefundenen Legionellen-Spezies konnte ein Homolog dieses hochkonservierten Gens gefunden werden. Somit sind Abgleiche mit der Sequenz dieses Gens bzw. des Proteins ideal zur Untersuchungen der in dieser Arbeit verwendeten Stämme.

Ein *Alignment* der verschiedenen *mip* Sequenzen zeigte erwartungsgemäß eine deutliche Clusterbildung bei den *L. pneumophila* Stämmen. Es waren dabei zwei nah verwandte Gruppen von *L. pneumophila* Stämmen entstanden (Abb. 56A, blau). Alle anderen Stämme bildeten eine eigene Gruppe. Es zeigte sich innerhalb dieses Clusters erneut ein Zusammenhang aller *Legionella* Stämme, die ein Chemotaxissystem besitzen (rot). Die Verbindungen dieser Stämme entsprachen der zuvor beschriebenen Verteilung. Somit zeigte die Untersuchung eines Gens des Kern-Genoms dieselbe Verteilung wie die Gene des Flagellensystems oder des Chemotaxissystems.

Die Untersuchung der Proteinsequenzen von Mip zeigte ein sehr ähnliches Bild. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass Untersuchungen von Proteinen meistens größere Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Stämmen zeigen. Das liegt daran, dass verschiedene Basentriplets für dieselbe Aminosäure kodieren können. Somit muss eine größere Diversität auf DNA-Ebene nicht zwangsläufig zu einem Unterschied auf Protein-Ebene führen. Auch auf dieser Ebene gruppieren die *L. pneumophila* Stämme in zwei Teile (Abb. 56B, blau). Auch hier gruppieren die Stämme mit Chemotaxis eindeutig (rot). Dabei sind die verwandtschaftlichen Entfernungen dieses Clusters zu den Stämmen LLAP10, *L.*

micdadei, *L. hackelia* und *L. oakridgensis* relativ groß. Trotzdem konnten sowohl in der Chemotaxisgruppe als auch in der nicht-chemotaktischen Gruppe ein aflagellierter Stamm gefunden werden.

Im Weiteren konnte man auch gut erkennen, dass die beiden LLAP Stämme relativ geringe Ähnlichkeiten aufweisen. Dies zeigt, dass die Nomenklatur bei der Entdeckung der Stämme willkürlich war und sich ganz speziell auf das Vorkommen dieser Bakterien in Amöben bezog.

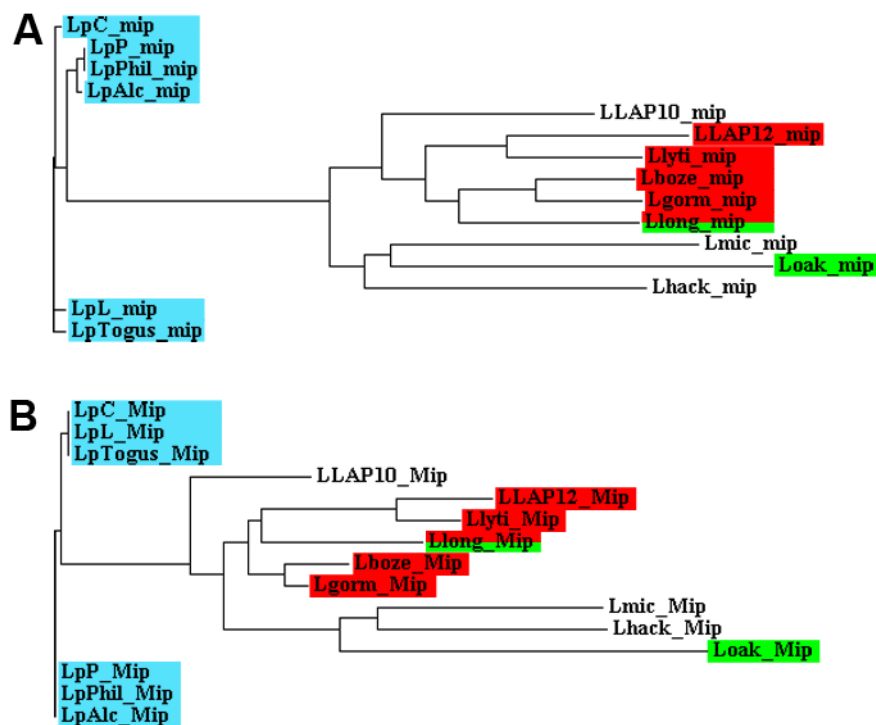


Abb. 56: *In silico* Untersuchungen des (A) Gens *mip* und des (B) Proteins Mip von verschiedenen *Legionella* Stämmen mittels *ClustalW Alignment*. Die Entfernung vom Ursprung (links) entspricht dem relativen evolutionären Abstand zwischen den Stämmen. Abkürzungen: *L. pneumophila* Corby, LpC; *L. pneumophila* Paris, LpP; *L. pneumophila* Lens, LpL; *L. pneumophila* Philadelphia I, LpPhil; *L. pneumophila* Alcoy, LpAlc ; *L. pneumophila* Togus-1, LpTogus; *Legionella-like amoebal pathogen 10* (*L. fallonii*), LLAP10; *Legionella-like amoebal pathogen 12* (*L. drancourtii*), LLAP12; *L. micdadei*, Lmic; *L. hackelia*, Lhack; *L. bozemanii*, Lboze; *L. gormanii*, Lgorm; *L. lytica*, Llyti; *L. longbeachae* NSW150, Llong; *L. oakridgensis*, Loak. Farbschema: Blau, *L. pneumophila* Stämme; Rot, *Legionella* Stämme mit Chemotaxissystem; Grün, *Legionella* Stämme ohne Flagelle.

4.5.4.4 Der alternative σ^{28} Faktor FliA

Das Gen *fliA* ist der einzige Regulator des Flagellensystems, den alle untersuchten Stämme mit oder ohne Flagellenapparat besitzen. Aufgrund dieses Alleinstellungsmerkmals und der Funktion als wichtiges Regulatorprotein beim Aufbau der Flagelle wurden auch hierzu *Alignment*-Studien angefertigt.

Auf Ebene der DNA zeigte sich das bekannte Bild. Die *L. pneumophila* Stämme bildeten zwei verwandte Gruppen, während alle anderen ebenfalls gruppierten (Abb. 57A, blau). Auch diese Untersuchungen zeigten große Gemeinsamkeiten der Stämme mit Chemotaxisoperon (rot). Eine Verbindung der aflagellierten Stämme durch das *fliA* Gen wurde nicht gefunden.

Auf Protein-Ebene bildeten alle *L. pneumophila* Stämme einen Cluster (Abb. 57B, blau). Dem gegenüber stehen alle non-*pneumophila* Stämme mit der Gruppe der Stämme mit Chemotaxisystem. Auch hier konnten Untersuchungen des Proteins FliA keine Gemeinsamkeiten zwischen den beiden aflagellierten Stämmen aufzeigen (grün).

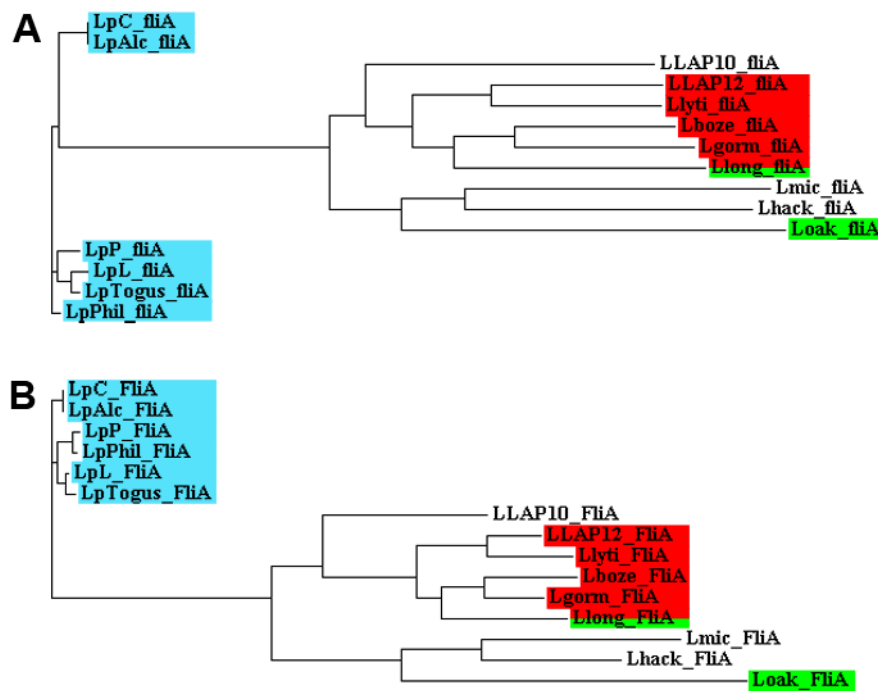


Abb. 57: *In silico* Untersuchungen des (A) Gens *fliA* und des (B) Proteins FliA von verschiedenen *Legionella* Stämmen mittels *ClustalW Alignment*. Die Entfernung vom Ursprung (links) entspricht dem relativen evolutionären Abstand zwischen den Stämmen. Abkürzungen: *L. pneumophila* Corby, LpC; *L. pneumophila* Paris, LpP; *L. pneumophila* Lens, LpL; *L. pneumophila* Philadelphia I, LpPhil; *L. pneumophila* Alcoy, LpAlc; *L. pneumophila* Togus-1, LpTogus; *Legionella-like amoebal pathogen 10* (*L. fallonii*), LLAP10; *Legionella-like amoebal pathogen 12* (*L. drancourtii*), LLAP12; *L. micdadei*, Lmic; *L. hackelia*, Lhack; *L. bozemanii*, Lboze; *L. gormanii*, Lgorm; *L. lytica*, Llyti; *L. longbeachae* NSW150, Llong; *L. oakridgensis*, Loak. Farbschema: Blau, *L. pneumophila* Stämme; Rot, *Legionella* Stämme mit Chemotaxissystem; Grün, *Legionella* Stämme ohne Flagelle.

4.5.4.5 FliM – ein Bestandteil des Basalkörpers

Nachdem FliA als wichtiger Regulator zur Steuerung des Aufbaus des Flagellenapparates untersucht wurde, sollte mit *fliM* / FliM auch ein struktureller Bestandteil der Flagelle betrachtet werden. FliM ist zusammen mit FliG und FliN Bestandteil des zytoplasmatischen C-Rings des Flagellenapparates. Dies ist der so genannte *switch*-Komplex und hat drei Funktionen. Zum einen sorgt er für die Assemblierung und die Integrität der Flagelle. Weiterhin ist dieser Ring wichtig für den Energietransfer von dem Protonengetriebenen Motor zum rotierenden Bereich der Flagelle. Schließlich sorgt dieser Komplex auch für die Regulation der Rotationsrichtung (Berg 2003). Vor kurzem konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass zyklisches dimeres GMP (cyclic dimeric GMP, c-di-GMP) die Rotation

der Flagelle durch Interaktion mit FliG und FliM steuert (Fang and Gomelsky 2010). Durch Bindung des Antwort-Regulators CheY aus dem Chemotaxissystem an FliM kommt es zur Entstehung von dynamischen Motor-assoziierten FliM Molekülen, die nicht-dynamische Moleküle verdrängen und somit für die Rotation sorgen (Delalez et al. 2010).

Vergleichende *in silico* Analysen könnten unabhängig von regulatorischen Proteinen einen gemeinsamen Ursprung im strukturellen Aufbau des Flagellensystems aller *Legionella* Stämme zeigen. Da *fliM* in beiden aflagellierten Stämmen nicht vorhanden war, wurden nur die flagellierten Stämme miteinander verglichen.

Ein Vergleich auf DNA-Ebene zeigte jeweils eine Gruppe der *L. pneumophila* (blau) und der non-*pneumophila* Stämme (Abb. 58A). Innerhalb der non-*pneumophila* Stämme konnte außerdem der Cluster der Stämme mit Chemotaxissystem gefunden werden (rot).

Auf Protein-Ebene zeigte sich ein identisches Bild. Die *L. pneumophila* Stämme auf der einen und die non-*pneumophila* Stämme mit der Untergruppe der Chemotaxis-Stämme auf der anderen Seite (Abb. 58B). Eine Veränderung des Dendrogramms im Vergleich zu Mip wurde nicht gefunden. Auch auf struktureller Ebene bleiben die Verwandtschaftsverhältnisse gleich. Dies spricht für eine einen sehr frühen gemeinsamen Vorfahren mit einem Flagellensystem. Der Erwerb oder Verlust des Chemotaxissystems und der Verlust des Flagellensystems muss entwicklungsgeschichtlich später stattgefunden haben.

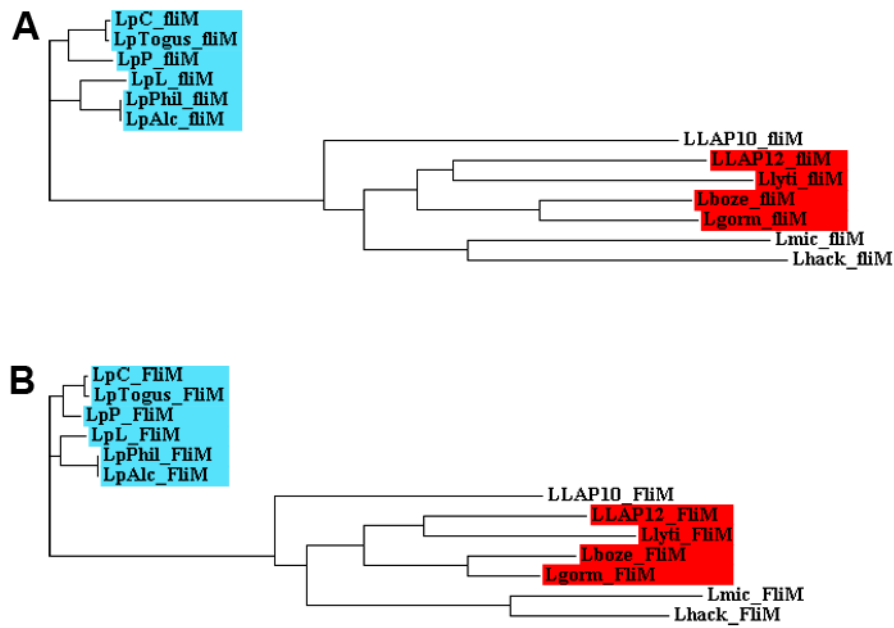


Abb. 58: *In silico* Untersuchungen des (A) Gens *fliM* und des (B) Proteins FliM von verschiedenen *Legionella* Stämmen mittels *ClustalW Alignment*. Die Entfernung vom Ursprung (links) entspricht dem relativen evolutionären Abstand zwischen den Stämmen. Abkürzungen: *L. pneumophila* Corby, LpC; *L. pneumophila* Paris, LpP; *L. pneumophila* Lens, LpL; *L. pneumophila* Philadelphia I, LpPhil; *L. pneumophila* Alcoy, LpAlc; *L. pneumophila* Togus-1, LpTogus; *Legionella-like amoebal pathogen 10* (*L. fallonii*), LLAP10; *Legionella-like amoebal pathogen 12* (*L. drancourtii*), LLAP12; *L. micdadei*, Lmic; *L. hackelia*, Lhack; *L. bozemanii*, Lboze; *L. gormanii*, Lgorm; *L. lytica*, Llyti. Farbschema: Blau, *L. pneumophila* Stämme; Rot, *Legionella* Stämme mit Chemotaxissystem.

5. Diskussion

5.1 Das Flagellenregulon und seine Virulenzassoziation

In der transmissiven Wachstumsphase bereitet sich *Legionella* auf die Freisetzung aus den infizierten Amöben oder Makrophagen vor. Es werden zahlreiche Virulenzgene exprimiert und die Flagelle ausgebildet. Der zweiphasige Lebenszyklus von *Legionella* kann durch die Anzucht in YEB-Flüssigmedium nachgestellt werden, wobei das post-exponentielle Wachstum der transmissiven Phase entspricht. Die regulatorischen Proteine FleQ, RpoN und FliA von *L. pneumophila* haben wichtige Funktionen für die Regulation der Flagellenregulationskaskade (Heuner et al. 1997; Heuner et al. 2002; Jacobi et al. 2004; Brüggemann et al. 2006; Heuner and Albert-Weissenberger 2008; Albert-Weissenberger et al. 2010). Vergleichende Microarray-Analysen mit $\Delta fleQ$, $\Delta rpoN$ und $\Delta fliA$ Mutanten konnten für den Stamm Paris darüber hinaus auch Hinweise für die Regulation weiterer bekannter Virulenzfaktoren liefern (Albert-Weissenberger et al. 2010).

In dieser Arbeit wurde die Expression der Regulatoren RpoN, FleQ und FliA sowie des Flagellins (FlaA) sowohl auf der Transkriptions- als auch auf der Proteinebene über alle Wachstumsphasen von *Lp* Corby hinweg analysiert. Bisher wurde gezeigt, dass FliA für die Ausprägung des virulenten Phänotyps essentiell ist und Mutanten weniger invasiv sind (Hammer et al. 2002; Heuner et al. 2002). Jedoch konnte die Bedeutung der regulatorischen Proteine FleQ und RpoN weder durch einen intrazellulären Wachstumsdefekt der Mutanten in murinen Alveolarmakrophagen (MH-S Zelllinien) noch im natürlichen Wirt *A. castellanii* bestätigt werden (Jacobi et al. 2004; Albert-Weissenberger et al. 2010). In dieser Arbeit wurde die *in vivo* Fitness von $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta fliA$ und $\Delta lpc2402$ defizienten Stämmen in einem kombinierten Replikations- / Überlebensversuch betrachtet. Dieser Versuch ermöglicht die Betrachtung der verschiedensten Faktoren, die Bakterien benötigen, um intrazellulär zu replizieren und über ein extrazelluläres Stadium hinweg weitere Amöben infizieren zu können. So kann mit diesem Versuch die verminderte Fitness in Bezug auf Adhäsion, Aufnahme, Replikation und das extrazelluläre Überleben in der virulenten Phase untersucht werden. Dafür wurden Infektionen mit *A. castellanii* durchgeführt und die Bakterien für weitere Infektionen frisch angezogener *A. castellanii* verwendet. Eine viermalige Re-Infektion der Amöben mit zwei verschiedenen *Legionella* Stämmen in Konkurrenz zueinander ermöglichte es sogar geringe Defizite bezüglich der *in vivo* Fitness aufzuzeigen. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ defiziente Mutanten der Stämme *Lp* Corby und Paris in ihrer Virulenz gegenüber *A. castellanii* reduziert sind. Sie wurden in dem kombinierten Replikations- / Überlebensversuch bei einer gleichzeitigen

Infektion der Zellen mit der Mutante und den zugehörigen wildtypischen Bakterien von den wildtypischen Bakterien verdrängt. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung der Flagellenregulationskaskade für die Virulenz der Bakterien (Hammer et al. 2002; Heuner et al. 2002). Microarray-Experimente mit $\Delta rpoN$ Mutanten zeigten, dass die Gene für die Arginin Biosynthese, aber auch Effektoren des *dot/icm* Typ IV Sekretionssystems (*sidE*, *sdeD*, *sdcA*, *sidF*) und weitere bekannte Virulenzfaktoren, wie die sekretierte Matrix-Metalloproteinase Msp (*proA*), *htpB*, *enhA*, *enhC* und *argR* über RpoN positiv reguliert werden (Albert-Weissenberger 2008; Albert-Weissenberger et al. 2010). In Microarray-Analysen mit der $\Delta fleQ$ Mutante waren die am stärksten reprimierten Gene dem Histidin-Operon zugehörig. Des Weiteren wurden die Virulenzfaktoren *gspA*, *mip* und *lvgA* weniger exprimiert (Albert-Weissenberger et al. 2010). Daraus lässt sich schließen, dass die beobachtete verminderte Fitness der $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ defizienten Legionellen ihren Grund in der geringen Expression von Virulenzgenen und/oder in einer veränderten metabolischen Aktivität hat.

Ein virulenzattenuierter Phänotyp wurde für die $\Delta fliA$ Mutante bereits beschrieben (Hammer et al. 2002; Heuner et al. 2002) und stimmt mit den in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen überein. Die hier gezeigte reduzierte Fitness der $\Delta fliA$ defizienten Legionellen war im Stamm Paris deutlicher ausgeprägt als im Stamm Corby. Dies lässt sich durch die in dieser Arbeit gezeigte unterschiedliche *fliA* Expression in beiden Stämmen erklären. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 5.3 detailliert diskutiert. Als putativ von FliA regulierte Gene werden in der Literatur neben *flaA* und *motA* auch mehrere Gene mit GGDEF/EAL Domänen und zwei homologe EnhA (*enhanced entry protein A*) Proteine diskutiert (Brüggemann et al. 2006; Albert-Weissenberger et al. 2010). In der $\Delta fliA$ Mutante von *Lp* Paris waren diese Gene sehr stark reprimiert. Möglicherweise sind diese Gene Ursache für die reduzierte Fitness der $\Delta fliA$ Mutante.

Microarray Daten aus dem Stamm *Lp* Paris zeigten eine starke Abhängigkeit des Gens *lpp0952* von der FliA-Expression (Brüggemann et al. 2006). Das homologe Gen aus *Lp* Corby *lpc2402* kodiert ebenfalls für ein putatives regulatorisches Protein mit GGDEF/EAL und PAC/PAS Domänen (siehe Kapitel 1.10.3). Eine mögliche Verbindung zum Phänotyp der $\Delta fliA$ Mutante wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Es wurde spekuliert, dass solche Proteine bei der Regulation von Virulenz- und Flagellengen involviert sind, indem sie die Menge an zyklischem di-GMP beeinflussen können (D'Argenio and Miller 2004; Wolfe and Visick 2008).

In dieser Arbeit wurden RT-PCR Analysen durchgeführt, durch die eine Regulation von *lpc2402* durch FliA auch im Stamm *Lp* Corby bestätigt werden konnte. Da $\Delta lpc2402$ Mutanten keinen Wachstumsdefekt im kombinierten Replikations- / Überlebensversuchen zeigten, sollte eine durch das Fehlen von FliA hervorgerufene verminderte Expression von *lpc2402* kein wichtiger Faktor für die beobachtete verminderte Fitness von $\Delta fliA$ Mutanten sein. Weiterhin konnte eine stark verminderte Expression des Flagellins (FlaA) entsprechend der $\Delta fliA$ Mutante nicht nachgewiesen werden. Auch hierbei spielt das Gen *lpc2402* wahrscheinlich keine Rolle.

Andere Studien konnten im Stamm *Lp* JR32 ein homologes Gen von *lpc2402* (*lpg891*) identifizieren (Levi et al. 2011). Dieses besitzt eine Diguanylatcyclase-Aktivität. Interessanterweise führt hierbei die verstärkte Aktivität des Gens und nicht etwa seine Inaktivierung bei einer Infektion von *A. castellanii* zu einem Replikationsdefekt. Dies erklärt, warum bei $\Delta lpc2402$ Mutanten in den hier durchgeführten Versuchen keine verminderte Fitness zeigten. Weiterhin wurden zwei weitere zyklische Diguanylat-Signalproteine (*lpg1057* und *lpg1114*) identifiziert, die an der Regulation der Flagellenexpression beteiligt sein sollen.

5.2 Genexpression des Flagellenregulons

FleQ ist als der wichtigste Regulator der Flagellenregulationskaskade bekannt und arbeitet mit dem alternativen σ^{54} Faktor RpoN zusammen (Jacobi et al. 2004). Die von beiden Faktoren regulierten Gene scheinen fast ausschließlich zum Flagellenapparat zu gehören. Microarray-Analysen konnten Einblicke in die regulatorischen Abhängigkeiten in Stamm *Lp* Paris geben (Albert-Weissenberger et al. 2010). In *Lp* Paris verstärkt FleQ die Transkription von *fliA* unabhängig von RpoN. Darauf folgend wird die Transkription der Klasse III Gene und schließlich die Transkription der Klasse IV Gene innerhalb der Flagellenregulationskaskade induziert (Albert-Weissenberger et al. 2010). Für die Stämme *Lp* Paris und Corby gab es bisher widersprüchliche Aussagen über die Regulation von *fliA*. Für *Lp* Paris wurde eine FleQ-abhängigen *fliA* Transkription und für den Stamm Corby eine FleQ-unabhängige *fliA* Transkription publiziert (Jacobi et al. 2004; Albert-Weissenberger et al. 2010).

Aufgrund voneinander abweichenden Annahmen und der hier beschriebenen *in vivo* Fitness-Defekte wurden die Expression von FleQ, RpoN, FliA und FlaA für den Stamm Corby auf Transkriptions- und Proteinebene im Detail untersucht. Besonders zur Proteinexpression

waren kaum Daten vorhanden und wurden hier mit den Microarray-Daten für den Stamm Paris verglichen.

Das Muster der Genexpression für die $\Delta fleQ$, $\Delta rpoN$, $\Delta fliA$ und $\Delta flaA$ defizienten Corby Stämme war in großen Teilen mit den aus Microarray-Analysen getroffenen Annahmen vergleichbar. Somit konnten die Microarray-Daten experimentell bestätigt und die Übertragbarkeit auf einen weiteren Stamm gezeigt oder Unterschiede aufgezeigt werden. Das *rpoN* Gen war auch hier konstitutiv expremiert und nur in der $\Delta fliA$ Mutante zeigte sich eine leichte Veränderung in Bezug auf dieses Gen. Dieser Effekt kann durch eine veränderte Verfügbarkeit der RNA-Polymerase erklärt werden. Durch die Deletion des σ^{54} Faktors RpoN haben andere σ -Faktoren wie σ^{28} Faktor FliA Zugang zu einer größeren Anzahl an freien RNA-Polymerase-Molekülen (Nyström 2004). Die in dieser Arbeit gezeigte *fliA* Expression in Stamm Corby wich entscheidend von den für *Lp* Paris publizierten Daten ab (Albert-Weissenberger 2008; Albert-Weissenberger et al. 2010). In den Regulationsmutanten $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ wird *fliA* während der exponentiellen Phase nur in sehr geringer Menge expremiert, dann aber von der postexponentiellen zur stationären Phase verstärkt transkribiert. Daten aus *Lp* Paris zeigten eine starke Verminderung der *fliA* Expression nur in der $\Delta fleQ$ und nicht in der $\Delta rpoN$ Mutante (Albert-Weissenberger et al. 2010). Die Expression von *flaA* wird in den $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ Mutanten über die spätexponentielle zur stationären Phase nicht reduziert. Im Vergleich zu *Lp* Corby Wildtyp wird in $\Delta rpoN$ Mutanten die Flagellinproduktion in der postexponentiellen Phase leicht induziert. Die vorliegenden Ergebnisse passen zu den Expressionsmustern von FliA in den $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ Mutanten, da FliA der wichtigste positive Regulator der *flaA* Expression ist (Heuner et al. 1997; Heuner et al. 2002; Albert-Weissenberger et al. 2010). Jacobi und Kollegen haben publiziert, dass die Expression von *fliA* und *flaA* in $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ defizienten Corby Stämmen nicht reduziert ist, jedoch wurde in beiden Mutanten eine verminderte Menge Flagellin detektiert (Jacobi et al. 2004). Im Gegensatz dazu zeigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western Blot Experimente mit den $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ Mutanten eine Induktion der Flagellinproduktion in der postexponentiellen Phase. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten dadurch begründet sein, dass die hier durchgeführten Untersuchungen mit, in Flüssigmedium angezogenen, Bakterien durchgeführt wurden, wogegen Jacobi und Kollegen die Bakterien bei 30°C auf Agarplatten anzüchteten (Jacobi et al. 2004).

Die vorliegende Arbeit konnte somit genaue Daten zur wachstumsabhängigen Expression und dem Zusammenspiel der verschiedenen Regulatoren liefern. Besonders die Proteinexpression von FleQ und FliA konnte erstmals wachstumsabhängig gezeigt werden.

5.3 Die Expression des alternativen σ^{28} Faktors *fliA*

Kürzlich wurde für *Lp* publiziert, dass DksA die basale *fliA* Promotoraktivität in der exponentiellen Phase unabhängig von ppGpp reguliert, während beide Faktoren bei der Aktivierung der *fliA* Expression ab der postexponentiellen Phase zusammenarbeiten (Dalebroux et al. 2010a; Dalebroux et al. 2010b). Allerdings konnte weder der Promotor noch die Initiationsstelle von *fliA* identifiziert werden (Dalebroux et al. 2010b).

Um den Initiationsort der *fliA* Transkription zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit 5'RACE Experimente durchgeführt. Die identifizierte Promotorregion scheint spezifisch für RpoD zu sein. Aufgrund der Ähnlichkeiten der Konsensussequenzen ist allerdings auch eine RpoS abhängige Initiation möglich. Interessanterweise ist die der Transkriptionsstart auch in $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ Mutanten an der gleichen Stelle. Dies zeigt, dass die basale Transkriptionsinitiation von *fliA* nicht von RpoN oder FleQ beeinflusst wird. Darüber hinaus liegt eine A/T- reiche Sequenz zwischen der -10 Stelle (*discriminator site*) und dem Transkriptionsstart von *fliA* (Abb. 59). In dem Modell zum Einfluss von DskA wurde beschrieben, dass solche A/T-reiche Sequenzen typisch für DskA/ppGpp gesteuerte, RpoD-abhängigen Promotoren sind (Dalebroux et al. 2010a; Dalebroux et al. 2010b).

In früheren Studien wurde gezeigt, dass das 2-Komponentensystem LetA/LetS direkten oder über CsrA indirekten Einfluß auf die *fliA* Expression hat (Molofsky and Swanson 2004; Molofsky et al. 2005). 5'RACE Experimente zeigten aber keinen veränderten Transkriptionsstartpunkt in der $\Delta letA$ Mutante. Da hierbei der Startpunkt unabhängig von der Transkriptmenge bestimmt wurde, reguliert LetA/LetS die *fliA* Expression möglicherweise über die Menge der *fliA* mRNA.

Mit Hilfe von (RT-)PCRs und Western Blots wurde in den $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ Mutanten eine von der wildtypischen Expression abweichende *fliA* Expression nachgewiesen. Der Wildtyp zeigte in der spät exponentiellen Phase eine starke Expression und abnehmende Expression bis zur stationären Phase. In der $\Delta rpoN$ Mutante ist die *fliA* Expression in der postexponentiellen Phase induziert und bleibt auf hohem Niveau. In $\Delta fleQ$ Mutanten findet

während der exponentiellen und postexponentiellen Phase lediglich eine basale *fliA* Expression statt, wobei von der spät exponentiellen zur postexponentiellen Phase nur ein sehr geringer Anstieg der *fliA* Expression zu beobachten ist.

Diese Ergebnisse lassen sich durch das DksA-Modell erklären (Abb. 59). In der $\Delta rpoN$ Mutante von Stamm Paris ist FleQ aktiv und arbeitet unabhängig von RpoN als Aktivatorprotein in der exponentiellen Phase (Albert-Weissenberger et al. 2010). In der $\Delta fleQ$ Mutante fehlt das Aktivatorprotein, so könnte die DksA-vermittelte, basale *fliA* Expression durch die, in der postexponentiellen Phase ansteigende, ppGpp-Menge hochreguliert werden.

Weiterhin wurde publiziert, dass die *fliA* Transkription RpoS abhängig ist (Bachman and Swanson 2001). Demnach wird die Transkription von *rpoS* in der exponentiellen Phase induziert, aber das Protein sammelt sich erst in der stationären Phase in den Bakterien an. Durch die verzögerte Translation wirkt RpoS erst in den späteren Wachstumsphasen positiv auf die Genregulation ein (Hales and Shuman 1999b; Bachman and Swanson 2001).

Elektronenmikroskopische Studien zeigten eine gerade *Hook*-Struktur am Pol der Zelle. Da der Basalkörper für die Verankerung des *Hooks* in der Membran sorgt, muss dieser ebenfalls vorhanden sein. Trotz des Fehlens von FliA kommt es zu einem zeitlich korrekten Aufbau des Basalkörpers und des *Hooks* und nicht zu einer negativen Rückkopplung auf die Flagellenkaskade aufgrund des Fehlens von FliA bzw. FlaA.

Die Identifikation der Transkriptionsstartpunkte für *fliA* konnte zeigen, dass *fliA* putative Promotorsequenzen für RpoD besitzt. Nicht auszuschließen ist aufgrund der Sequenzähnlichkeiten auch eine direkte Induktion durch akkumuliertes RpoS in der postexponentiellen Phase. Am Wahrscheinlichsten ist die Transkriptionsinduktion über RpoD, wobei FleQ in bisher unbekannter Weise verstärkend auf die Transkription wirkt. Wie gezeigt ist FleQ hier aber nicht essentiell für eine basale Aktivität des *fliA* Promotors.

Der Transkriptionsstartpunkt und die Expression von FliA auf RNA- und Protein-Ebene konnten in dieser Arbeit erstmals beschrieben werden und bieten wichtige Informationen zur Regulation der Flagelle und dem damit verbundenen virulenten Phänotyp. Mit FliA konnte der Überblick über die wichtigsten Regulatoren in *L. pneumophila* vervollständigt werden.

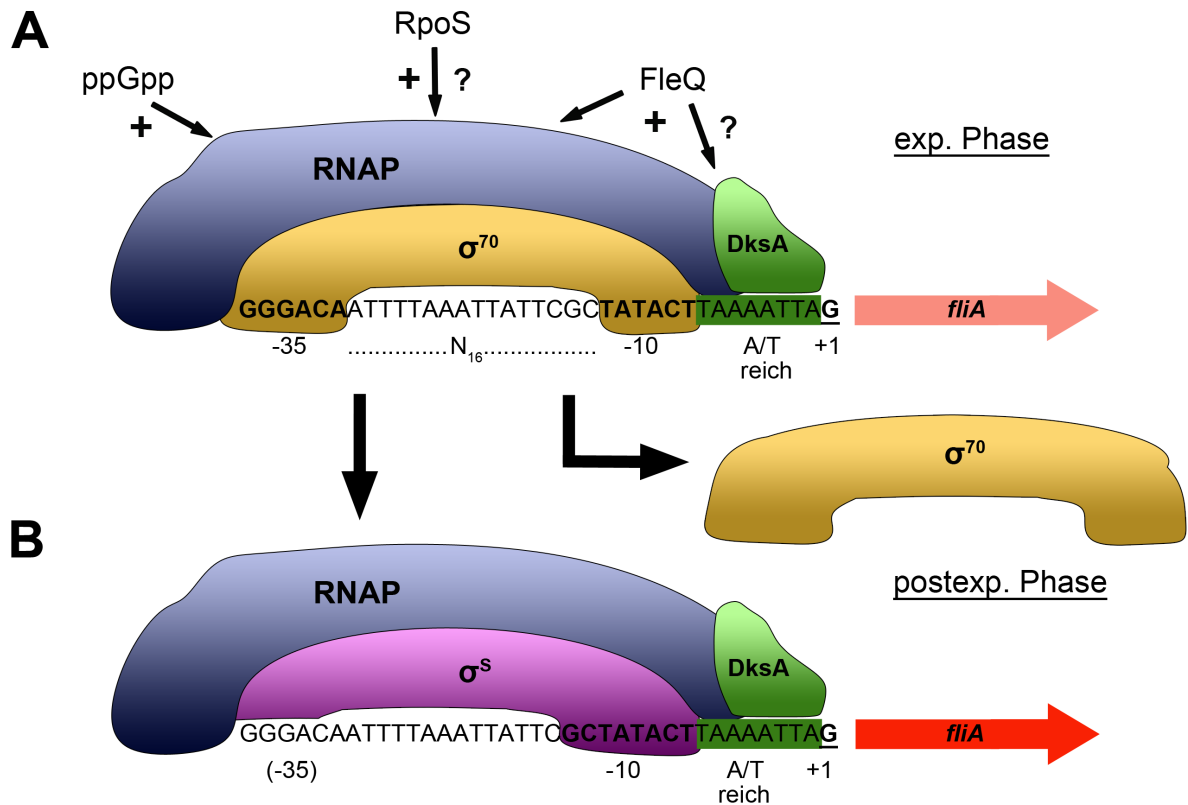


Abb. 59: Modell der Regulation der *fliA* Expression in *L. pneumophila* Corby. (A) In der exponentiellen Phase wird eine basale *fliA* Promotor Aktivität (rot) unabhängig von FleQ durch DksA (grün) und den σ^{70} Faktor RpoD (gelb) gesteuert. DksA interagiert dabei mit einer A/T-reiche Sequenz downstream der -10 Box (grün). Während der spätexponentiellen Phase wird die *fliA* Expression durch ppGpp und FleQ aktiviert. (B) In der postexponentiellen Phase kommt es aufgrund des steigenden ppGpp-Gehalts in der Zelle zu einem Austausch des σ^{70} Faktors RpoD durch den alternativen σ^S Faktor RpoS (rosa). Dadurch erhöht sich die *fliA* Expression (rot) durch die RNA-Polymerase (blau). Modifiziert nach (Dalebroux et al. 2010a).

5.4 Der strukturelle Aufbau des Flagellenapparats

In dieser Arbeit wurden elektronenmikroskopische Studien mit $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta fliA$, $\Delta flaA$ und $\Delta fliD$ Mutanten von *Lp* Corby durchgeführt, um den Einfluss der jeweiligen Gendefizienz auf die Flagellierung der Bakterien zu untersuchen. Es wurde bereits gezeigt, dass $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ Mutanten von *Lp* Flagellin exprimieren. Die durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ Mutanten trotzdem nicht flagelliert sind und auch keinen *Hook* besitzen. Daraus kann abgeleitet werden, dass in diesen Stämmen vermutlich aufgrund des fehlenden Basalkörpers auch kein *Hook* oder das Filament gebildet werden kann.

Flagellierte *E. coli* und *Salmonella* Stämme zeigen direkt am Austrittsort der Flagelle eine gebogene Haken-artige Struktur (Chilcott and Hughes 2000; Terashima et al. 2008). Diese sorgt dafür, dass die anschließende Flagelle in einem gewissen Winkel zur polaren Achse des Bakteriums steht. Durch Rotationsbewegungen der Flagelle können sich die Bakterien fortbewegen. In der Polregion von $\Delta fliA$, $\Delta flaA$ und $\Delta fliD$ defizienten *Lp Corby* Stämmen wurde ein ungewöhnlich, gerader *Hook* identifiziert. In $\Delta fliA$ und $\Delta flaA$ Mutanten wird kein Flagellin exprimiert, was die Ausbildung einer Flagelle ausschließt. Wie bereits gezeigt wurde, produziert die $\Delta fliD$ Mutante zwar Flagellin, aber durch das Fehlen des, die Flagelle abschließenden, FliD *Cap* Proteins kann kein Filament gebildet werden (Molofsky et al. 2005). Da ein gerader *Hook* nachweisbar ist, konnte somit gezeigt werden, dass der Basalkörper des Flagellenapparates unabhängig von FliA, FlaA und FliD aufgebaut wird. RpoN und FleQ sind in *Lp Corby* für den Aufbau des Basalkörpers unverzichtbar, deshalb konnte in der Elektronenmikroskopie kein *Hook* detektiert werden. Die Wichtigkeit dieser beiden Faktoren konnten hier direkt gezeigt werden. Wie in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt wurde, besitzen Legionellen einen geraden *Hook*. Solche Strukturen wurden auch schon in anderen Bakterien wie *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* beschrieben (Morooka et al. 1983).

5.5 Evolutionäre Veränderungen von *Legionella* auf Genomebene

L. pneumophila kommt als Umweltkeim weltweit in aquatischen Lebensräumen vor und lebt dort parasitierend in freilebenden Protozoen und in Biofilmen (Rowbotham 1980; Fliermans et al. 1981; Fields 1996). Die Bakterien müssen sich an die vorherrschenden Umweltbedingungen anpassen um möglichst effizient ihre natürliche Wirte infizieren und sich dort intrazellulär vermehren zu können. Die evolutionär erworbenen Fähigkeiten zur Nutzung von Amöben als Wirt machen aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen den Infektionsmechanismen die Infektion von humanen Lungenmakrophagen möglich. Da eine Übertragung von Mensch zu Mensch nicht möglich ist, stellt der Mensch kein Reservoir, sondern den Endwirt dar. Das bedeutet, nur der evolutionäre Selektionsdruck in aquatischen Systemen diente den Bakterien der Anpassung ihres Virulenzverhaltens. Die Ko-Evolution von *L. pneumophila* und Amöben spiegelt sich auch den Genomsequenzen wieder. Eine unerwartet hohe Anzahl und Variation an Eukaryoten-ähnlichen Proteinen und Proteine mit Sequenzmotiven von Eukaryoten wurde bereits in *L. pneumophila* gefunden (Cazalet et al. 2004). Es wurde vermutet, dass diese Proteine, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Infektionszyklus exprimiert werden, die Funktion eukaryotischer Proteine nachahmen und

deshalb vom Wirt nicht als fremdartig erkannt werden (Cazalet et al. 2004). Im Weiteren sind viele dieser Proteine von *Legionella* sekretierte Effektoren, die Wirtsfunktionen unterdrücken und eine intrazelluläre Replikation ermöglichen (Nora et al. 2009; Hubber and Roy 2010). Es wird spekuliert, dass die Bakterien einige dieser Gene durch horizontalen Gentransfer von Eukaryoten erhalten haben (de Felipe et al. 2005; Lurie-Weinberger et al. 2010).

Im Weiteren besitzt das Genom von *Legionella* eine hohe Plastizität, da innerhalb des Genoms viele genomische Inseln, konjugative Elemente und auch Plasmide enthalten sind. Mittels horizontalem Gentransfer innerhalb des Genus *Legionella* und zwischen verschiedenen *L. pneumophila* Arten kann es zu weiteren Anpassungen und Variationen in der evolutionären Entwicklung kommen. So wurde eine 65 kb große Pathogenitätsinsel aus *L. pneumophila* Philadelphia auch in anderen *L. pneumophila* Arten und *Legionella* Spezies gefunden (Brassinga et al. 2003; Cazalet et al. 2008a). Ein weiteres Beispiel ist ein Lipopolysaccharid-Cluster aus Serogruppe 1, der auch in anderen *L. pneumophila* Arten nachgewiesen werden konnte (Cazalet et al. 2008a).

Man kann sagen, dass horizontaler Gentransfer für *Legionella* in der Evolution eine sehr wichtige Rolle spielt. Dafür sprechen auch die Eigenschaften dieser Bakterien für fremde DNA natürlich kompetent zu sein und das Vorkommen eines intakten Rekombinationssystems (Stone and Kwaik 1999; Sexton and Vogel 2004). Auch das Übertragen von DNA über Typ IV Pili und das Springen von genomischen Inseln mit Hilfe von Integrasen sind weitere Hinweise darauf (Stone and Kwaik 1999; Glöckner et al. 2008). Mehrere Arbeitsgruppen zeigten für *L. pneumophila* eine klonale Populationsstruktur, das bedeutet, dass alle weltweit vorkommenden Arten von einigen wenigen gemeinsamen Vorläuferzellen abstammen (Selander et al. 1985; Coscolla et al. 2006; Edwards et al. 2008). Spätere Untersuchungen ließen aber vermuten, dass Rekombination eine wichtige Rolle für die Evolution von *L. pneumophila* spielt (Bumbaugh et al. 2002; Ko et al. 2002; Ko et al. 2003; Coscolla and Gonzalez-Candelas 2007). Als Mittelweg zwischen beiden Möglichkeiten wurden allerdings klonale Komplexe zusammen mit hohen Rekombinationsraten bereits beschrieben (Feil and Spratt 2001; Spratt et al. 2001). Untersuchungen von 181 prokaryotischen Genomen konnten ein Art Netzwerk aller Prokaryoten auf genomischer Ebene feststellen (Dagan et al. 2008). Häufiger Austausch von Genen innerhalb einer Spezies und zwischen verschiedenen Arten bildeten die Genome von Bakterien. Die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der Prokaryoten sind in Abb. 60 gezeigt.

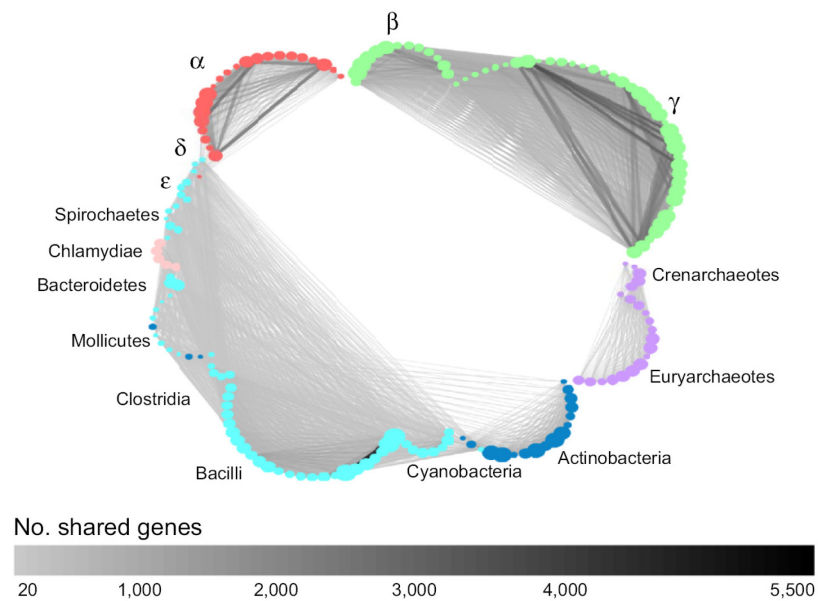


Abb. 60: Horizontaler Gentransfer innerhalb der Prokaryoten. Dargestellt sind die α -, β -, γ -, δ - und ε -Proteobakterien sowie weitere Klassen von Prokaryoten. Grau dargestellte Linien zwischen einzelnen Klassen und Ordnungen zeigen die Anzahl der homologen Gene der verschiedenen Genome (Dagan et al. 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 15 verschiedene *Legionella* Genome im Bezug auf das Flagellensystem näher untersucht. In allen untersuchten *L. pneumophila* Stämmen konnte ein vollständiger und intakter Flagellenapparat festgestellt werden. Auch in anderen Arten des Genus *Legionella* wurde ein solches System gefunden. Eine nähere Betrachtung der Ähnlichkeiten des Flagellenregulons auf DNA-Ebene zwischen allen untersuchten Stämmen zeigte eine zu erwartende hohe Ähnlichkeit zwischen den *L. pneumophila* Stämmen (

Tab. 20). Zu allen anderen *Legionella* Spezies beträgt die Ähnlichkeit zwischen 60-70 %. Die Struktur und die Verteilung der einzelnen Operone innerhalb des Genoms sind in diesen Stämmen sehr ähnlich. Trotz der großen Anzahl der Gene konnten diese in fast allen Stämmen gefunden werden. Sogar ebenfalls untersuchte, angrenzende genomische Bereiche sind in diesen Stämmen hoch konserviert. In vielen non-*pneumophila* Stämmen fehlen die Gene *fliK* und *fliK2*. In den Stämmen *L. hackelia*, *L. bozemanii* und *L. gormanii* fehlt jeweils nur eines der beiden Gene. Möglicherweise ergänzen sich beide Gene in ihren Funktionen und können ein Fehlen kompensieren. FliK wurde in *Salmonella* oder *Yersinia* bisher als Regulator der Hook-Länge beschrieben (Hirano et al. 1994; Shibata et al. 2007). Dabei dient das Protein selbst als ein Art Größenmaßstab für den Hook. Durch Insertionen in das *fliK* Gen wurde der Hook verlängert und durch Deletionen verkürzt. *Knock-out* Mutanten für *fliK* zeigten enorm verlängerte Strukturen von 40-900 nm (Hirano et al. 1994). Solche Strukturen konnten in den untersuchten Stämmen ohne *fliK* Homolog mit Hilfe von EM-Aufnahmen nicht beobachtet werden. Möglicherweise gibt es weitere Gene im Genom, die eine solche Funktion besitzen und das Fehlen kompensieren können. Möglicherweise wird die Länge des Hooks bei *Legionella* durch andere Mechanismen reguliert.

Tab. 20: DNA-Identitäten der Flagellen-Operone zwischen den verschiedenen *Legionella* Spezies. Als Referenzstamm wurde *Lp Corby* verwendet. Untersucht wurden sowohl das Flagellen-Regulon (Fla-Reg.) als Gesamtheit als auch die einzelnen Flagellen-assoziierten Operone. Die Analysen wurden mit Hilfe von BLAST durchgeführt. Alle Einheiten in Prozent (%). Abkürzungen: *L. pneumophila* Corby, LpC; *L. pneumophila* Paris, LpP; *L. pneumophila* Lens, LpL; *L. pneumophila* Philadelphia I, LpPhil; *L. pneumophila* Alcoy, LpAlc; *L. pneumophila* Togus-1, LpTogus; *Legionella-like amoebal pathogen 10* (*L. fallonii*), LLAP10; *Legionella-like amoebal pathogen 12* (*L. drancourtii*), LLAP12; *L. micdadei*, Lmic; *L. hackelia*, Lhack; *L. bozemanii*, Lboze; *L. gormanii*, Lgorm; *L. lytica*, Llyti; *L. longbeachae* NSW150, Llong; *L. oakridgensis*, Loak. Die gepunkteten Linien dienen der Übersicht.

	Fla-											
LpC	Reg.	<i>fliK2</i>	<i>flgB</i>	<i>flaA</i>	<i>fliK</i>	<i>fleS</i>	<i>fliM</i>	<i>motA2</i>	<i>flgA</i>	<i>fleQ</i>	<i>rpoN</i>	<i>motY</i>
LpP	97	99	96	95	99	98	97	97	97	98	98	97
LpL	97	97	98	96	97	97	97	97	97	97	98	96
LpPhil	98	98	96	96	100	100	99	98	97	98	98	96
LpAlc	99	99	99	100	100	99	99	100	100	98	100	98
LpTogus	97	98	96	96	98	97	97	98	98	98	98	96
LLAP10	70	65	71	68	53	74	75	76	71	78	77	71
LLAP12	67	fehlt	68	64	fehlt	72	72	73	68	71	75	65
Lmic	62	61	65	64	46	67	70	69	63	70	72	65
Lhack	63	61	67	66	fehlt	68	69	70	63	70	70	59
Lboze	66	fehlt	69	66	51	71	73	73	70	70	76	67
Lgorm	65	fehlt	69	67	51	72	72	73	67	71	76	65
Llyti	65	fehlt	67	63	fehlt	71	72	71	65	fehlt	74	67
Llong	72	fehlt	86 [#]	fehlt	fehlt	76 [#]	76 [#]	fehlt	83 [#]	73	75	fehlt
Loak	65	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	72 [#]	fehlt	60 [#]	fehlt	67	fehlt

[#] in diesem Operon fehlt ein Teil der konservierten Gene, welche dem Flagellen-Regulon angehören

Als einzige bisher bekannte Ausnahmen für das Vorkommen eines Flagellensystems sind *L. longbeachae* NSW150 und *L. oakridgensis* zu nennen. Für *L. longbeachae* wurde bereits zuvor das Fehlen des Flagellenregulons und das Vorhandensein eines chemotaktischen Systems beschrieben (Cazalet et al. 2010). In dieser Arbeit konnte nun mit *L. oakridgensis*

erstmalig ein Stamm beschrieben werden, der weder ein Flagellensystem noch ein Chemotaxis-System besitzt. Während *L. longbeachae* noch einige regulatorische Gene des Flagellensystems wie *fliA*, *fleS*, *fleR* und *fleQ* besitzt, kann in *L. oakridgensis* nur noch der σ^{28} Faktor *fliA* und der entsprechende anti- σ^{28} Faktor *flgM* gefunden werden. Alle anderen Gene fehlen diesem Stamm. Besonders interessant ist neben dem Fehlen der Struktur- und Motorproteine auch das Fehlen von Regulatoren wie dem 2-Komponentensystem FleS/R oder FleQ. Diesen Proteinen werden neben der Regulation der Expression der Flagelle auch anderen Funktionen innerhalb des biphasischen Lebenszyklus zugeordnet (Jacobi et al. 2004; Albert-Weissenberger et al. 2010). Auch in diesem Fall sind keine kompensatorischen Proteine bekannt. FleQ dient als Masterregulator des Flagellensystems. In Deletionsmutanten wurde über das Fehlen des gesamten Flagellenapparates spekuliert (Jacobi et al. 2004). In dieser Arbeit konnte dieses bestätigt werden. Eine *Hook*-Struktur konnte nicht detektiert werden. Wie bereits erwähnt, zeigten Microarray-Experimente für die Δ *fleQ* Mutante ein verändertes Expressionsmuster einiger Stoffwechselgene und Virulenzfaktoren (Albert-Weissenberger et al. 2010).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Legionella* Spezies wurden auch in Bezug auf die wichtigsten bereits bekannten Promotoren untersucht. Dazu gehören die bereits beschriebenen Promotoren der Gene *fleQ*, *fleS* und *flaA* (Heuner et al. 1995; Jacobi et al. 2004; Albert-Weissenberger et al. 2010). Für die Gene *fliM* und *flhF* wurde aufgrund von Microarray-Daten bereits über mögliche RpoN- und / oder FleQ-abhängige Promotoren spekuliert (Albert-Weissenberger 2008), während für *fliA* eine mögliche Abhängigkeit von RpoS (σ^S), aber noch kein Transkriptionsstartpunkt beschrieben wurde (Bachman and Swanson 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein solcher Startpunkt erfolgreich bestimmt und ein Modell für die Expression von *fliA* beschrieben werden (siehe Kapitel 5.3).

Viele der bekannten Promotorstrukturen konnten auch in den untersuchten Stämmen gefunden werden. Dies zeigt große Gemeinsamkeiten der verschiedenen Arten in der Regulation ihrer Flagellen-spezifischen Gene. Je weiter man in der Kaskade des Flagellensystems in Richtung Filament geht, desto höher sind die Promotorbereiche konserviert. Die Promotoren der Gene *fliA* und *flaA* zeigen beinahe identische Sequenzen in diesen Bereichen. Alle Elemente des in dieser Arbeit bestimmten Transkriptionsstarts von *fliA* sind vorhanden. Auch die Stämme *L. longbeachae* und *L. oakridgensis* als nicht-flagellierte Legionellen besitzen *fliA* mit dem entsprechenden Promotor. Dadurch kann man vermuten, dass FliA nicht nur für die Flagelle wichtig ist, sondern auch für weitere, noch unbekannte

Funktionen der Zelle eine sehr große Rolle spielt. Andere Regulatoren wie FleQ, FleR oder FleS sind in *L. oakridgensis* nicht vorhanden und spielen somit eine untergeordnete Rolle. Für frühe Gene der Regulationskaskade werden die Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen Stämmen geringer und es ist schwierig für alle untersuchten Stämme eine Konsensus-Sequenz zu finden. Möglicherweise kommt es in diesen frühen Phasen der Regulation zu gewissen Stamm-spezifischen Veränderungen in Genexpression. Um dies zu klären müssen die Promotoren dieser Gene in unterschiedlichen *Legionella* Arten genauer untersucht und der Transkriptionsstart experimentell bestimmt werden.

5.6 Ein putatives Chemotaxisssystem

Im Jahr 2010 wurde erstmals für *Legionella* ein putatives Chemotaxisssystem beschrieben (Cazalet et al. 2010). Dieses System besitzt ein 2-Komponentensystem für die Signaltransduktion bestehend aus der Histidin-Kinase CheA und dem Antwort-Regulator CheY. Weiterhin gibt es zwei Homologe für das Adaptor-Protein CheW. Die Methyltransferase CheR sorgt für eine Anpassung an dauerhafte Stimulation durch chemische Signale. Zusammen bilden diese Proteine den evolutionär konservierten Kern des Chemotaxisystems von Bakterien und Archaeen (Kentner and Sourjik 2006; Hazelbauer et al. 2008).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit konnten erstmals für die Stämme *L. drancourtii* (LLAP12), *L. bozemanii*, *L. gormanii* und *L. lytica* ebenfalls ein solches putatives Chemotaxisssystem zeigen. Auf DNA-Ebene liegen die Ähnlichkeiten zu dem Referenzgenom von *L. longbeachae* zwischen 68-75 % (Tab. 21). Diese Ähnlichkeiten könnten auf ein sehr frühes Rekombinationsereignis in den Stämmen mit Chemotaxisssystem oder einen Verlust des Systems in den anderen Stämmen hindeuten. Besonders interessant ist, dass identische Bereiche des Kerngenoms *upstream* und *downstream* des Chemotaxisoperons in allen untersuchten Stämmen zu finden ist. Während die identischen genomischen *upstream*-Bereiche sich direkt vor dem Operons befinden, liegen die identischen *downstream*-Bereiche unterschiedlich weit vom Chemotaxisoperon entfernt. Auch Stämme ohne dieses Operon besitzen diese genomischen Bereiche. Die Ähnlichkeiten schwanken hier im Bereich von 51-79 %. Bei Stämmen ohne das Chemotaxisssystem ist dieses Operon deletiert, das bedeutet die flankierenden genomischen Bereiche liegen direkt nebeneinander.

Tab. 21: DNA-Identitäten des Kerngenoms *upstream* und *downstream* des Chemotaxis-Operons (*che*). *L. longbeachae* NSW 150 wurde als Referenzgenom verwendet. Die Analysen wurden mit Hilfe von BLAST durchgeführt. Alle Einheiten in Prozent (%). Abkürzungen: *L. pneumophila* Corby, LpC; *L. pneumophila* Paris, LpP; *L. pneumophila* Lens, LpL; *L. pneumophila* Philadelphia I, LpPhil; *L. pneumophila* Alcoy, LpAlc; *L. pneumophila* Togus-1, LpTogus; *Legionella-like amoebal pathogen* 10 (*L. fallonii*), LLAP10; *Legionella-like amoebal pathogen* 12 (*L. drancourtii*), LLAP12; *L. micdadei*, Lmic; *L. hackelia*, Lhack; *L. bozemanii*, Lboze; *L. gormanii*, Lgorm; *L. lytica*, Llyti; *L. longbeachae* NSW150, Llong; *L. oakridgensis*, Loak.

Llong	<i>upstream</i>	<i>che</i>	<i>downstream</i>
LpC	75	fehlt	75
LpP	75	fehlt	75
LpL	75	fehlt	75
LpPhil	75	fehlt	53
LpAlc	75	fehlt	75
LpTogus	75	fehlt	72
LLAP10	75	fehlt	76
LLAP12	77	70	75
Lmic	72	fehlt	71
Lhack	73	fehlt	58
Lboze	79	75	83
Lgorm	79	74	78
Llyti	75	68	73
Loak	51	fehlt	59

Auch Untersuchungen des G/C-Gehalts des Chemotaxisoperons und den angrenzenden genomischen Bereichen der verschiedenen *Legionella* Stämme zeigten keine besonderen Auffälligkeiten (

Tab. 22). Im Vergleich zum Flagellenregulon (38-42 %) ist der G/C-Gehalt etwas niedriger und bewegt sich beim Chemotaxissystem bei etwa 37-39 %. Interessant ist die Beobachtung, dass der direkt *upstream* liegende genomische Bereich einen G/C-Gehalt von 42-45 % und der *downstream* liegende Bereich einen Wert von 33-38 % hat. Für das dazwischen liegende Chemotaxisoperon kann somit nicht aufgrund eines besonders hohen oder niedrigen G/C-Gehalts auf eine Insertion rückgeschlossen werden. Möglicherweise liegt dieses Insertionsereignis entwicklungsgeschichtlich aber auch sehr weit zurück, sodass sich das Kern-Genom und das Chemotaxissystem gemeinsam weiterentwickeln konnten. Nach vielen Generationszeiten wären diese Unterschiede dann nicht mehr eindeutig zu erkennen. Die relativ hohen Schwankungen des G/C-Gehalts der flankierenden Bereiche könnten weitere Hinweise auf einen horizontalen Gentransfer oder ein Rekombinationsereignis in diesem Bereich liefern. Dieses wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht näher betrachtet.

Tab. 22: G/C-Gehalt des Flagellenregulons (Fla-Reg.) und der genomischen Bereiche *upstream* und *downstream* des Chemotaxis-Operons (*che*). Die Angaben wurden mit Hilfe des *MBCF Oligo Calculator* der *Havard University* erstellt. Alle Einheiten in Prozent (%). Abkürzungen: *L. pneumophila* Corby, LpC; *L. pneumophila* Paris, LpP; *L. pneumophila* Lens, LpL; *L. pneumophila* Philadelphia I, LpPhil; *L. pneumophila* Alcoy, LpAlc; *L. pneumophila* Togus-1, LpTogus; *Legionella-like amoebal pathogen* 10 (*L. fallonii*), LLAP10; *Legionella-like amoebal pathogen* 12 (*L. drancourtii*), LLAP12; *L. micdadei*, Lmic; *L. hackelia*, Lhack; *L. bozemanii*, Lboze; *L. gormanii*, Lgorm; *L. lytica*, Llyti; *L. longbeachae* NSW150, Llong; *L. oakridgensis*, Loak; Flagellen-Regulon, Fla-Reg..

Stamm	Fla-Reg.	<i>upstream</i>	<i>che</i>	<i>downstream</i>
Llong	38	42	37	33
LpC	39	43	fehlt	35
LpP	39	43	fehlt	36
LpL	39	44	fehlt	36
LpPhil	39	43	fehlt	36
LpAlc	39	43	fehlt	36
LpTogus	39	43	fehlt	36
LLAP10	39	44	fehlt	37
LLAP12	40	45	39	37
Lmic	42	45	fehlt	38
Lhack	41	43	fehlt	36
Lboze	39	42	37	33
Lgorm	39	43	38	34
Llyti	40	44	38	37
Loak	40	45	fehlt	36

In den untersuchten *Legionella* Arten gibt es die Möglichkeiten, dass einerseits alle gemeinsamen Vorfahren der Legionellen ein Chemotaxissystem besaßen und einige Stämme dieses durch Deletion verloren haben. Aufgrund einer bestimmten ökologischen Nische konnte nur eine kleine Gruppe an *Legionella* Arten dieses System behalten. Andererseits kann auch ein gemeinsamer Vorläufer der Legionellen mit Chemotaxissystem dieses in der

Evolution über horizontalen Gentransfer erhalten hat. In dieser Arbeit durchgeführte Stammbaumanalysen für die Gene *mip*, *fliA* und *fliM* zeigen eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen gemeinsamen Vorfahren der Legionellen mit Chemotaxisoperon. Aufgrund der großen Ähnlichkeiten zwischen den Dendrogrammen des Flagellen-Regulons, des Chemotaxisystems und der untersuchten Gene des Kern-Genoms muss das Ereignis des Gentransfers schon relativ früh in der Evolution stattgefunden haben. Dadurch entwickelten sich die untersuchten Systeme im gleichen Maße. Mit Hilfe weiterer Genomsequenzierungen könnte man weitere Erkenntnisse zum Ursprung des Chemotaxisystems erhalten. Im nachfolgenden Kapitel sollen weitere verwandtschaftliche Beziehungen diskutiert werden.

5.7 Evolutionäre Verwandtschaft zwischen verschiedenen *Legionella* Spezies

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde gibt es *Legionella* Arten mit und ohne Flagellensystem sowie mit und ohne Chemotaxisystem. *L. oakridgensis* besitzt keines der beiden Systeme. Eine wichtige Frage lautet: Wie sind all diese Kombinationen in der Evolution entstanden?

Eine aktuelle Studie hat sechs *L. pneumophila* Genome in Bezug auf horizontalen Gentransfer, mobile genetische Elemente und Rekombination näher untersucht und konnte für *L. pneumophila* ein Kern-Genom von über 2400 konservierten Genen definieren (Abb. 61) (Gomez-Valero et al. 2011). Etwa zwei Drittel der bisher beschriebenen 278 *dot/icm* Effektoren konnten in den untersuchten Stämmen gefunden werden. Im Weiteren konnten in diesen Stämmen häufige Rekombinationsereignisse detektiert werden. Die Autoren konnten zeigen, dass jedes bakterielle Chromosom ein Mosaik aus größeren chromosomalen Fragmenten mit unterschiedlicher Herkunft (Eukaryoten, Prokaryoten, Genus *Legionella* oder Spezies *L. pneumophila*) ist.

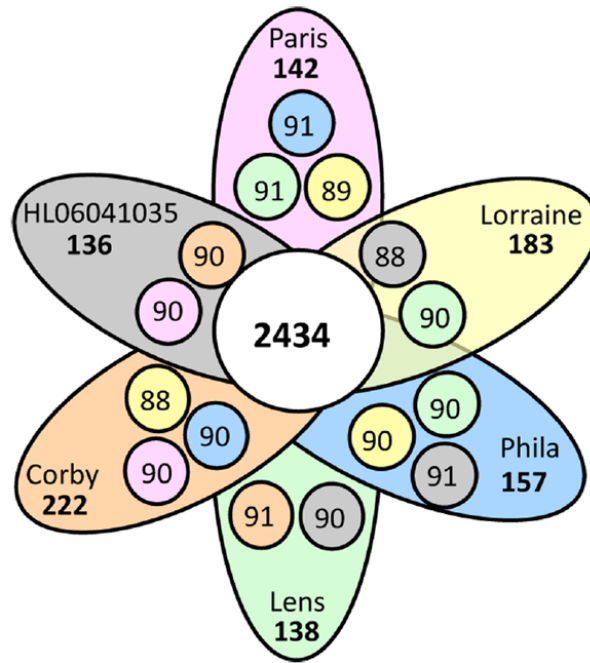


Abb. 61: Kern-Genom von sechs verschiedenen *Legionella pneumophila* Stämmen. Gezeigt sind die Stämme *L. pneumophila* Corby, Paris, Lens, Philadelphia I, Lorraine und HL06041035 mit untereinander homologen und spezie-spezifischen Genen (Gomez-Valero et al. 2011).

Verwandtschaftsbeziehungen können auch zwischen verschiedenen *Legionella* Arten bestehen. Stammbaumanalysen mit Hilfe der Gensequenz von *mip* konnten ein weit verzweigtes Dendrogramm zeigen (Gaia et al. 2011). Betrachtet man nun innerhalb des Stammbaums die in dieser Arbeit untersuchten Legionellen näher, so kann man feststellen, dass die Arten mit putativem Chemotaxissystem wahrscheinlich von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen (Abb. 62, rot). Zwei Möglichkeiten der Entstehung wurden im vorangegangenen Kapitel diskutiert. Zur Überprüfung dieser Theorien könnten nun gezielt Arten aus diesem Stammbaum für weitere Analysen untersucht werden. Beispiele für mögliche Stämme mit Chemotaxissystem sind *L. anisa*, *L. dumoffii* oder *L. cherrii*.

Der Verlust des Flagellensystems scheint dagegen mehrfach in der Evolution von *Legionella* vorgekommen sein. So sind die Stämme *L. longbeachae* und *L. oakridgensis* relativ weit voneinander entfernt und haben nur einen gemeinsamen Vorfahren, der alle anderen Legionellen mit einschließt. Möglicherweise findet man in *Legionella* Arten, die näher zu diesen beiden Stämmen verwandt sind, weitere Legionellen ohne Flagellensystem. In einer früheren Studie konnte zum Beispiel mit Hilfe von Southern Blot Hybridisierung und Western Blot für *L. israelensis* kein Flagellin nachgewiesen werden (Heuner et al. 1995). Aufgrund der

Komplexität des Flagellenregulons und der Anzahl der Gene, die über das gesamte Genom verteilt sind, ist zu vermuten, dass es mögliche intermediäre Formen des Flagellensystems gibt. Diese Formen besitzen möglicherweise neben Regulatoren noch einige Strukturgene. Der Verlust von 47 Genen in 11 verschiedenen Operonen dürfte, besonders in Hinblick auf die Beobachtung, dass nahezu alle flankierenden Bereiche des Flagellenregulons nicht betroffen sind, in der Evolution eine relative lange Zeit in Anspruch genommen haben.

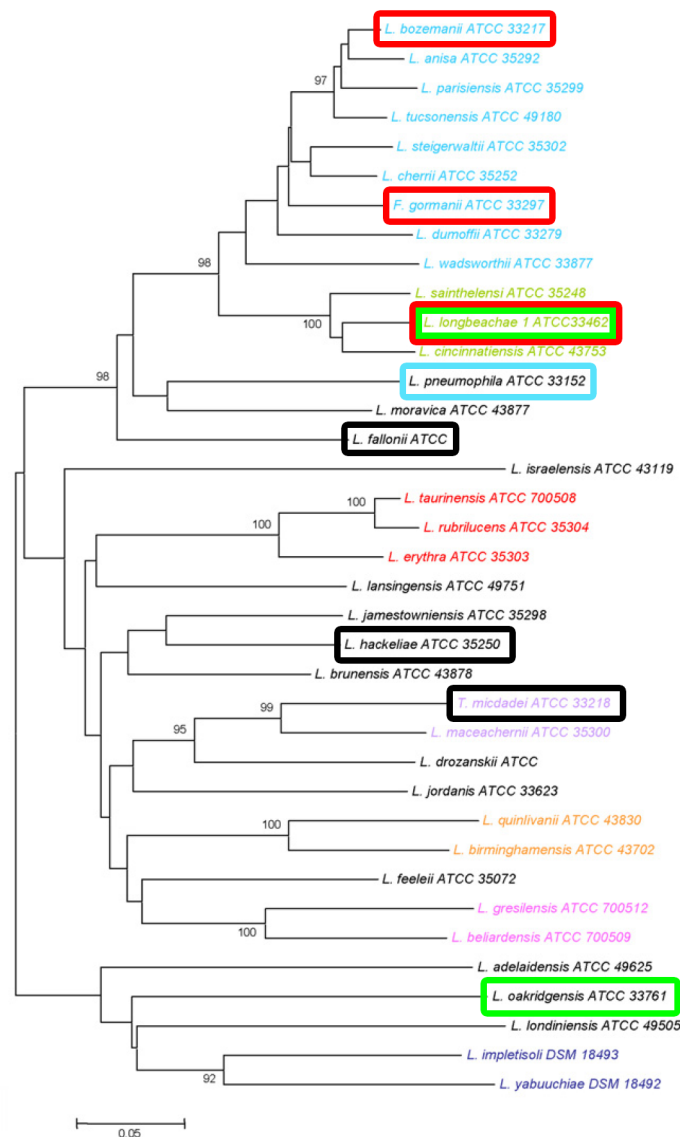


Abb. 62: Dendrogramm des Genus *Legionella* anhand von *mip* Sequenzen (Gaia et al. 2011). Die Entfernung vom Ursprung (links) entspricht dem relativen evolutionären Abstand zwischen den Stämmen. Farbschema: Blau, *L. pneumophila*; Rot, *Legionella* Stämme mit Chemotaxissystem; Grün, *Legionella* Stämme ohne Flagelle; Schwarz, im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte und flagellierte *Legionella* Stämme. Nicht alle hier untersuchten *Legionella* Stämme sind in dem Schaubild enthalten.

5.8 Ausblick

Nachdem in dieser Arbeit für die $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ Mutanten von *Lp* Corby und Paris erstmals ein *in vivo* Fitnessdefekt nachgewiesen konnte, sollten die Zielgene dieser Regulatoren deletiert und näher untersucht werden. Wie beschrieben sind neben den Flagellen-assoziierten Gene besonders einige Stoffwechselgene betroffen.

Für die weiteren Untersuchungen der FliA-Regulation sollten Deletionen in den Sigmafaktoren RpoS und RpoD sowie DksA hergestellt und näher untersucht werden. Solche Deletionen könnten allerdings weitgehende Auswirkungen auf die gesamte Zelle haben, sodass solche Untersuchungen relativ schwierig sind. Möglicherweise könnten induzierbare *knock-out* bzw. *knock-down* Studien (durch Temperatur, Medienzusätze bzw. RNAi) weitere Ergebnisse liefern. Auch sollten weitere Zielgene von FliA näher untersucht werden. Die in dieser Arbeit gezeigte Untersuchung von *lpc2402* konnte den Phänotyp der $\Delta fliA$ Mutante nicht näher erklären.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten eine sehr interessante und ungewöhnliche *Hook* Struktur. Präparationen des Basalkörpers mit hochauflösenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen und weitere Untersuchungen zur Bewegung der Flagelle sollten durchgeführt werden um weitere interessante Informationen zur Flagelle von *Legionella* zu erhalten. Zudem sollten die bisher nicht verfügbaren *Legionella* Stämme untersucht werden.

Die Evolution des Flagellenapparates zusammen mit dem Chemotaxissystem ist sehr spannend und bietet Raum für weitere Untersuchungen. In anderen Bakterien wurden bisher beide Systeme im Zusammenspiel zwischen Motilität und Erkennung von äußeren Signalen und der daraus resultierenden gerichteten Bewegung beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass verschiedene *Legionella* Stämme unterschiedliche Kombinationen beider Systeme tragen können. Mit *L. oakridgensis* konnte erstmals eine *Legionella* Spezies ohne diese Systeme beschrieben werden. Auf der anderen Seite wurden auch verschiedene Stämme (LLAP12, *L. bozemanii*, *L. gormanii* und *L. lytica*) gefunden, die beide Systeme tragen. Die Funktionen dieser Systeme liegen somit für jeden Stamm in einem anderen Bereich. Da *Legionella* in der Umwelt in nahezu allen wasserhaltigen Bereichen vorkommt, sollten weitere Studien sich mit der Anpassung der verschiedenen *Legionella* Stämme an unterschiedliche ökologische Nischen beschäftigen. Möglicherweise liegt darin die Erklärung für das Vorkommen der verschiedenen Kombinationen der beiden Systeme in *Legionella*.

Literaturverzeichnis

- Abdallah, A.M., Gey van Pittius, N.C., Champion, P.A., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B.J., & Bitter, W. (2007). Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*, 5, 883-891. In eng.
- Abdelaziz, D.H., Amr, K., & Amer, A.O. (2010). Nlrc4/Ipaf/CLAN/CARD12: more than a flagellin sensor. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 789-791. In eng.
- Abu-Zant, A., Asare, R., Graham, J.E., & Abu Kwaik, Y. (2006). Role for RpoS but not RelA of *Legionella pneumophila* in modulation of phagosome biogenesis and adaptation to the phagosomal microenvironment. *Infect Immun*, 74, 3021-3026. In eng.
- Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M., & Fields, B. (1996). *Legionella*-like amoebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis*, 2, 225-230. In eng.
- Adeleke, A.A., Fields, B.S., Benson, R.F., Daneshvar, M.I., Pruckler, J.M., Ratcliff, R.M., Harrison, T.G., Weyant, R.S., Birtles, R.J., Raoult, D., & Halablab, M.A. (2001). *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 1151-1160. In eng.
- Aizawa, S.I., & Kubori, T. (1998). Bacterial flagellation and cell division. *Genes Cells*, 3, 625-634. In eng.
- Akamine, M., Higa, F., Haranaga, S., Tateyama, M., Mori, N., Heuner, K., & Fujita, J. (2007). Interferon-gamma reverses the evasion of *Birc1e/Naip5* gene mediated murine macrophage immunity by *Legionella pneumophila* mutant lacking flagellin. *Microbiol Immunol*, 51, 279-287.
- Albert-Weissenberger, C. (2008). Regulation of the Flagellar Biogenesis in *Legionella pneumophila*. PhD Thesis. Wuerzburg, Germany: University of Wuerzburg. In english.
- Albert-Weissenberger, C., Sahr, T., Sismeiro, O., Hacker, J., Heuner, K., & Buchrieser, C. (2010). Control of flagellar gene regulation in *Legionella pneumophila* and its relation to growth phase. *J Bacteriol*, 192, 446-455. In eng.
- Amer, A., Franchi, L., Kanneganti, T.D., Body-Malapel, M., Ozoren, N., Brady, G., Meshinchi, S., Jagirdar, R., Gewirtz, A., Akira, S., & Nunez, G. (2006). Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem*, 281, 35217-35223.
- Aragon, V., Kurtz, S., & Cianciotto, N.P. (2001). *Legionella pneumophila* major acid phosphatase and its role in intracellular infection. *Infect Immun*, 69, 177-185.
- Aragon, V., Rossier, O., & Cianciotto, N.P. (2002). *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology*, 148, 2223-2231.
- Atlas, R.M., Williams, J.F., & Huntington, M.K. (1995). *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Appl Environ Microbiol*, 61, 1208-1213.

- Attmannspacher, U., Scharf, B.E., & Harshey, R.M. (2008). FliL is essential for swarming: motor rotation in absence of FliL fractures the flagellar rod in swarmer cells of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, 68, 328-341. In eng.
- Bachman, M.A., & Swanson, M.S. (2001). RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Mol Microbiol*, 40, 1201-1214.
- Bachman, M.A., & Swanson, M.S. (2004a). Genetic evidence that *Legionella pneumophila* RpoS modulates expression of the transmission phenotype in both the exponential phase and the stationary phase. *Infect Immun*, 72, 2468-2476. In eng.
- Bachman, M.A., & Swanson, M.S. (2004b). The LetE protein enhances expression of multiple LetA/LetS-dependent transmission traits by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*, 72, 3284-3293. In eng.
- Banerji, S., Bewersdorff, M., Hermes, B., Cianciotto, N.P., & Flieger, A. (2005). Characterization of the major secreted zinc metalloprotease- dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*, 73, 2899-2909.
- Banga, S., Gao, P., Shen, X., Fiscus, V., Zong, W.X., Chen, L., & Luo, Z.Q. (2007). *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 5121-5126. In eng.
- Bardy, S.L., Ng, S.Y., & Jarrell, K.F. (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology*, 149, 295-304. In eng.
- Bellinger-Kawahara, C., & Horwitz, M.A. (1990). Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med*, 172, 1201-1210. In eng.
- Bender, J., Rydzewski, K., Broich, M., Schunder, E., Heuner, K., & Flieger, A. (2009). Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis. *J Biol Chem*, 284, 27185-27194. In eng.
- Benkel, D.H., McClure, E.M., Woolard, D., Rullan, J.V., Miller, G.B., Jr., Jenkins, S.R., Hershey, J.H., Benson, R.F., Pruckler, J.M., Brown, E.W., Koleczak, M.S., Hackler, R.L., Rouse, B.S., & Breiman, R.F. (2000). Outbreak of Legionnaires' disease associated with a display whirlpool spa. *Int J Epidemiol*, 29, 1092-1098. In eng.
- Benson, R.F., & Fields, B.S. (1998). Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect*, 13, 90-99.
- Berg, H.C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem*, 72, 19-54. In eng.
- Birtles, R.J., Rowbotham, T.J., Raoult, D., & Harrison, T.G. (1996). Phylogenetic diversity of intra-amoebal *legionellae* as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Microbiology*, 142 (Pt 12), 3525-3530. In eng.
- Blackmon, J.A., Chandler, F.W., Cherry, W.B., England, A.C., 3rd, Feeley, J.C., Hicklin, M.D., McKinney, R.M., & Wilkinson, H.W. (1981). Legionellosis. *Am J Pathol*, 103, 429-465. In eng.
- Blair, D.F., & Berg, H.C. (1988). Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science*, 242, 1678-1681. In eng.

- Blocker, A., Komoriya, K., & Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3027-3030. In eng.
- Bosshardt, S.C., Benson, R.F., & Fields, B.S. (1997). Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella*. *Microb Pathog*, 23, 107-112. In eng.
- Brahmachary, P., Dashti, M.G., Olson, J.W., & Hoover, T.R. (2004). *Helicobacter pylori* FlgR is an enhancer-independent activator of sigma54-RNA polymerase holoenzyme. *J Bacteriol*, 186, 4535-4542. In eng.
- Brassinga, A.K., Hiltz, M.F., Sisson, G.R., Morash, M.G., Hill, N., Garduno, E., Edelstein, P.H., Garduno, R.A., & Hoffman, P.S. (2003). A 65-kilobase pathogenicity island is unique to Philadelphia-1 strains of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 185, 4630-4637. In eng.
- Brenner, D.J. (1980). *Legionella bozemanii* sp. nov. and *Legionella dumoffii* sp. nov.: classification of two additional species of *Legionella* associated with human pneumonia. *Current Microbiology* 4, 111-116.
- Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., & McDade, J.E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med*, 90, 656-658. In eng.
- Brieland, J., McClain, M., Heath, L., Chrisp, C., Huffnagle, G., LeGendre, M., Hurley, M., Fantone, J., & Engleberg, C. (1996). Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of Legionnaires' disease. *Infect Immun*, 64, 2449-2456. In eng.
- Brodhun, B., & Buchholz, U. (2011). [Epidemiology of Legionnaires' disease in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 54, 680-687. In ger.
- Broich, M., Rydzewski, K., McNealy, T.L., Marre, R., & Flieger, A. (2006). The global regulatory proteins LetA and RpoS control phospholipase A, lysophospholipase A, acyltransferase, and other hydrolytic activities of *Legionella pneumophila* JR32. *J Bacteriol*, 188, 1218-1226.
- Broome, C.V., & Fraser, D.W. (1979). Epidemiologic aspects of legionellosis. *Epidemiol Rev*, 1, 1-16. In eng.
- Brown, A., Garrity, G.M., & Vickers, R.M. (1981). *Fluoribacter dumoffii* (Brenner et al.) comb. nov. and *Fluoribacter gormanii* (Morris et al.) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 31, 111-115.
- Brown, P.N., Terrazas, M., Paul, K., & Blair, D.F. (2007). Mutational analysis of the flagellar protein FliG: sites of interaction with FliM and implications for organization of the switch complex. *J Bacteriol*, 189, 305-312. In eng.
- Brüggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M.A., Gouyette, C., Kunst, F., Steinert, M., Heuner, K., Coppee, J.Y., & Buchrieser, C. (2006). Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the *in vivo* transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol*, 8, 1228-1240.
- Buck, M., Bose, D., Burrows, P., Cannon, W., Joly, N., Pape, T., Rappas, M., Schumacher, J., Wigneshweraraj, S., & Zhang, X. (2006). A second paradigm for gene activation in bacteria. *Biochem Soc Trans*, 34, 1067-1071. In eng.

- Bumbaugh, A.C., McGraw, E.A., Page, K.L., Selander, R.K., & Whittam, T.S. (2002). Sequence polymorphism of *dotA* and *mip* alleles mediating invasion and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Curr Microbiol*, 44, 314-322. In eng.
- Burstein, D., Zusman, T., Degtyar, E., Viner, R., Segal, G., & Pupko, T. (2009). Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS Pathog*, 5, e1000508. In eng.
- Byrne, B., & Swanson, M.S. (1998). Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun*, 66, 3029-3034.
- Campodonico, E.M., Chesnel, L., & Roy, C.R. (2005). A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol Microbiol*, 56, 918-933. In eng.
- Carrillo, C.D., Taboada, E., Nash, J.H., Lanthier, P., Kelly, J., Lau, P.C., Verhulp, R., Mykityczuk, O., Sy, J., Findlay, W.A., Amoako, K., Gomis, S., Willson, P., Austin, J.W., Potter, A., Babiuk, L., Allan, B., & Szymanski, C.M. (2004). Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. *J Biol Chem*, 279, 20327-20338. In eng.
- Casati, S., Conza, L., Bruin, J., & Gaia, V. (2010). Compost facilities as a reservoir of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *Clin Microbiol Infect*, 16, 945-947. In eng.
- Case, C.L., Shin, S., & Roy, C.R. (2009). Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*, 77, 1981-1991. In eng.
- Cazalet, C., & Buchrieser, C. (2006). Genomics of *Legionella pneumophila*. In Dobrindt, U. & Hacker, J. (Eds.), *Pathogenomics: Genome analysis of pathogenic microbes* (pp. p.315-338). Weinheim: Wiley-VCH. In english.
- Cazalet, C., Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Lomma, M., Dervins-Ravault, D., Newton, H.J., Sansom, F.M., Jarraud, S., Zidane, N., Ma, L., Bouchier, C., Etienne, J., Hartland, E.L., & Buchrieser, C. (2010). Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS Genet*, 6, e1000851. In eng.
- Cazalet, C., Jarraud, S., Ghavi-Helm, Y., Kunst, F., Glaser, P., Etienne, J., & Buchrieser, C. (2008a). Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res*, 18, 431-441. In eng.
- Cazalet, C., Jules, M., & Buchrieser, C. (2008b). Genomics and transcriptomics of *Legionella pneumophila*: Insights into the lifestyle of an intracellular pathogen. In Heuner, K. & Swanson, M. (Eds.), *Legionella: Molecular Microbiology* (pp. p. 123-150). Norfolk: Caister Academic Press. In english.
- Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., Tichit, M., Jarraud, S., Bouchier, C., Vandenesch, F., Kunst, F., Etienne, J., Glaser, P., & Buchrieser, C. (2004). Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet*, 36, 1165-1173.

- Chen, J., Reyes, M., Clarke, M., & Shuman, H.A. (2007). Host cell-dependent secretion and translocation of the LepA and LepB effectors of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol*, 9, 1660-1671. In eng.
- Chien, M., Morozova, I., Shi, S., Sheng, H., Chen, J., Gomez, S.M., Asamani, G., Hill, K., Nuara, J., Feder, M., Rineer, J., Greenberg, J.J., Steshenko, V., Park, S.H., Zhao, B., Teplitskaya, E., Edwards, J.R., Pampou, S., Georghiou, A., Chou, I.C., Iannuccilli, W., Ulz, M.E., Kim, D.H., Geringer-Sameth, A., Goldsberry, C., Morozov, P., Fischer, S.G., Segal, G., Qu, X., Rzhetsky, A., Zhang, P., Cayanis, E., De Jong, P.J., Ju, J., Kalachikov, S., Shuman, H.A., & Russo, J.J. (2004). The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science*, 305, 1966-1968. In eng.
- Chilcott, G.S., & Hughes, K.T. (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 694-708. In eng.
- Cho, Y.J., Yi, H., Lee, J.H., Kim, D.W., & Chun, J. (2010). Genomic evolution of *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol*, 13, 646-651. In eng.
- Ciacchi-Woolwine, F., Blomfield, I.C., Richardson, S.H., & Mizel, S.B. (1998). *Salmonella* flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. *Infect Immun*, 66, 1127-1134. In eng.
- Cianciotto, N.P. (2001). Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*, 291, 331-343.
- Cianciotto, N.P. (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol*, 13, 581-588. In eng.
- Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S., & Tompkins, L.S. (1999). Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*, 67, 4427-4434. In eng.
- Conover, G.M., Derre, I., Vogel, J.P., & Isberg, R.R. (2003). The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol Microbiol*, 48, 305-321. In eng.
- Cornelis, G.R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, 4, 811-825. In eng.
- Coscolla, M., & Gonzalez-Candelas, F. (2007). Population structure and recombination in environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol*, 9, 643-656. In eng.
- Coscolla, M., Gosalbes, M.J., Catalan, V., & Gonzalez-Candelas, F. (2006). Genetic variability in environmental isolates of *Legionella pneumophila* from Comunidad Valenciana (Spain). *Environ Microbiol*, 8, 1056-1063. In eng.
- D'Argenio, D.A., & Miller, S.I. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology*, 150, 2497-2502.
- D'Auria, G., Jimenez-Hernandez, N., Peris-Bondia, F., Moya, A., & Latorre, A. (2010). *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. *BMC Genomics*, 11, 181. In eng.

- Dagan, T., Artzy-Randrup, Y., & Martin, W. (2008). Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10039-10044. In eng.
- Dalebroux, Z.D., Edwards, R.L., & Swanson, M.S. (2009). SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. *Mol Microbiol*, 71, 640-658. In eng.
- Dalebroux, Z.D., Svensson, S.L., Gaynor, E.C., & Swanson, M.S. (2010a). ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74, 171-199. In eng.
- Dalebroux, Z.D., Yagi, B.F., Sahr, T., Buchrieser, C., & Swanson, M.S. (2010b). Distinct roles of ppGpp and DksA in *Legionella pneumophila* differentiation. *Mol Microbiol*, 76, 200-219. In eng.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., & Kolter, R. (2001). Biofilm formation as a developmental process. *Methods Enzymol*, 336, 19-26. In eng.
- Dangl, J.L., & Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826-833. In eng.
- Darling, A.E., Mau, B., & Perna, N.T. (2010). progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One*, 5, e11147. In eng.
- Dasgupta, N., Arora, S.K., & Ramphal, R. (2000). *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 182, 357-364. In eng.
- Dasgupta, N., Ferrell, E.P., Kanack, K.J., West, S.E., & Ramphal, R. (2002). *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol*, 184, 5240-5250. In eng.
- Dasgupta, N., & Ramphal, R. (2001). Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 183, 6636-6644. In eng.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., & Ramphal, R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 50, 809-824. In eng.
- De Buck, E., Anne, J., & Lammertyn, E. (2007). The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology*, 153, 3948-3953. In eng.
- de Felipe, K.S., Glover, R.T., Charpentier, X., Anderson, O.R., Reyes, M., Pericone, C.D., & Shuman, H.A. (2008). *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathog*, 4, e1000117. In eng.
- de Felipe, K.S., Pampou, S., Jovanovic, O.S., Pericone, C.D., Ye, S.F., Kalachikov, S., & Shuman, H.A. (2005). Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *J Bacteriol*, 187, 7716-7726. In eng.

- Dean, G.E., Macnab, R.M., Stader, J., Matsumura, P., & Burks, C. (1984). Gene sequence and predicted amino acid sequence of the MotA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 159, 991-999. In eng.
- Debroy, S., Aragon, V., Kurtz, S., & Cianciotto, N.P. (2006a). *Legionella pneumophila* Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants. *Infect Immun*, 74, 5152-5160. In eng.
- DebRoy, S., Dao, J., Soderberg, M., Rossier, O., & Cianciotto, N.P. (2006b). *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19146-19151. In eng.
- Delalez, N.J., Wadhams, G.H., Rosser, G., Xue, Q., Brown, M.T., Dobbie, I.M., Berry, R.M., Leake, M.C., & Armitage, J.P. (2010). Signal-dependent turnover of the bacterial flagellar switch protein FlhM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 11347-11351. In eng.
- Den Boer, J.W., Yzerman, E.P., Schellekens, J., Lettinga, K.D., Boshuizen, H.C., Van Steenberghe, J.E., Bosman, A., Van den Hof, S., Van Vliet, H.A., Peeters, M.F., Van Ketel, R.J., Speelman, P., Kool, J.L., & Conyn-Van Spaendonck, M.A. (2002). A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis*, 8, 37-43.
- Diederer, B.M. (2008). *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect*, 56, 1-12. In eng.
- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B.C., Hacker, J., & Steinert, M. (2001). Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect Immun*, 69, 2116-2122. In eng.
- Diez, E., Lee, S.H., Gauthier, S., Yaraghi, Z., Tremblay, M., Vidal, S., & Gros, P. (2003). *Birc1e* is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to *Legionella pneumophila*. *Nat Genet*, 33, 55-60.
- Dobrindt, U., Chowdary, M.G., Krumbholz, G., & Hacker, J. (2010). Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol*, 199, 145-154. In eng.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., & Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 2, 414-424. In eng.
- Doebbeling, B.N., Ishak, M.A., Wade, B.H., Pasquale, M.A., Gerszten, R.E., Groschel, D.H., Kadner, R.J., & Wenzel, R.P. (1989). Nosocomial *Legionella micdadei* pneumonia: 10 years experience and a case-control study. *J Hosp Infect*, 13, 289-298. In eng.
- Donegan, E.A., Deal, M.M., Melanephry, M.C., Cordes, L.G., 3rd, Moss, C.W., Pons, V.G., & Brooks, G.F. (1981). Primary isolation of a new strain of the TATLOCK/Pittsburgh pneumonia agent (*Legionella micdadei*). *West J Med*, 134, 384-389. In eng.
- Doolittle, W.F., & Zhaxybayeva, O. (2007). Evolution: reducible complexity -- the case for bacterial flagella. *Curr Biol*, 17, R510-512. In eng.
- Drozanski, W. (1956). Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiol Pol*, 5, 315-317. In eng.

- Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C., & Krakowka, S. (1996). Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun*, 64, 2445-2448. In eng.
- Edelstein, P.H. (2007). Urine antigen tests positive for Pontiac fever: implications for diagnosis and pathogenesis. *Clin Infect Dis*, 44, 229-231. In eng.
- Edelstein, P.H. (2008). Legionnaires' Disease: History and Clinical Findings. In Heuner, K. & Swanson, M. (Eds.), *Legionella: Molecular Microbiology*. Caister Academic Press.
- Edelstein, P.H., & Meyer, R.D. (1984). Legionnaires' disease. A review. *Chest*, 85, 114-120. In eng.
- Edwards, M.T., Fry, N.K., & Harrison, T.G. (2008). Clonal population structure of *Legionella pneumophila* inferred from allelic profiling. *Microbiology*, 154, 852-864. In eng.
- Edwards, R.L., Jules, M., Sahr, T., Buchrieser, C., & Swanson, M.S. (2010). The *Legionella pneumophila* LetA/LetS two-component system exhibits rheostat-like behavior. *Infect Immun*, 78, 2571-2583. In eng.
- Erhardt, M., Namba, K., & Hughes, K.T. (2010). Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a000299. In eng.
- Ewig, S., Tuschy, P., & Fatkenheuer, G. (2002). Diagnosis and treatment of *Legionella* pneumonia. *Pneumologie*, 56, 695-703. In ger.
- Eylert, E., Herrmann, V., Jules, M., Gillmaier, N., Lautner, M., Buchrieser, C., Eisenreich, W., & Heuner, K. (2010). Isotopologue profiling of *Legionella pneumophila*: role of serine and glucose as carbon substrates. *J Biol Chem*, 285, 22232-22243. In eng.
- Fallon, R.J., & Rowbotham, T.J. (1990). Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool. *J Clin Pathol*, 43, 479-483. In eng.
- Fang, X., & Gomelsky, M. (2010). A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol*, 76, 1295-1305. In eng.
- Faulkner, G., Berk, S.G., Garduno, E., Ortiz-Jimenez, M.A., & Garduno, R.A. (2008). Passage through *Tetrahymena tropicalis* triggers a rapid morphological differentiation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 190, 7728-7738. In eng.
- Feil, E.J., & Spratt, B.G. (2001). Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol*, 55, 561-590. In eng.
- Fenchel, T. (2002). Microbial behavior in a heterogeneous world. *Science*, 296, 1068-1071. In eng.
- Fernandez, J.A., Lopez, P., Orozco, D., & Merino, J. (2002). Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 21, 729-735. In eng.
- Fettes, P.S., Forsbach-Birk, V., Lynch, D., & Marre, R. (2001). Overexpression of a *Legionella pneumophila* homologue of the *E. coli* regulator *csrA* affects cell size, flagellation, and pigmentation. *Int J Med Microbiol*, 291, 353-360. In eng.

- Fettes, P.S., Susa, M., Hacker, J., & Marre, R. (2000). Characterization of the *Legionella pneumophila* gene *ligA*. *Int J Med Microbiol*, 290, 239-250. In eng.
- Fields, B.S. (1996). The molecular ecology of *Legionellae*. *Trends Microbiol*, 4, 286-290.
- Fields, B.S., Benson, R.F., & Besser, R.E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*, 15, 506-526. In eng.
- Filloux, A., Hachani, A., & Bleves, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154, 1570-1583. In eng.
- Fischer, W., Prassl, S., & Haas, R. (2009). Virulence mechanisms and persistence strategies of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 337, 129-171. In eng.
- Flieger, A., Rydzewski, K., Banerji, S., Broich, M., & Heuner, K. (2004). Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity. *Infect Immun*, 72, 2648-2658.
- Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L., & Pope, D.H. (1981). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol*, 41, 9-16. In eng.
- Fong, D.H., Lemke, C.T., Hwang, J., Xiong, B., & Berghuis, A.M. (2010). Structure of the antibiotic resistance factor spectinomycin phosphotransferase from *Legionella pneumophila*. *J Biol Chem*, 285, 9545-9555. In eng.
- Fortier, A., Doiron, K., Saleh, M., Grinstein, S., & Gros, P. (2009). Restriction of *Legionella pneumophila* replication in macrophages requires concerted action of the transcriptional regulators Irf1 and Irf8 and nod-like receptors Naip5 and Nlrc4. *Infect Immun*, 77, 4794-4805. In eng.
- Francis, N.R., Sosinsky, G.E., Thomas, D., & DeRosier, D.J. (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol*, 235, 1261-1270. In eng.
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C., & Brachman, P.S. (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic pneumonia. *N Engl J Med*, 297, 1189-1197. In eng.
- Frisk, A., Jyot, J., Arora, S.K., & Ramphal, R. (2002). Identification and functional characterization of *flgM*, a gene encoding the anti-sigma 28 factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 184, 1514-1521. In eng.
- Furuhata, K., Ogihara, K., Okuno, R., Oonaka, K., & Fukuyama, M. (2009). Growth in *Acanthamoeba* sp. and antibiotic susceptibility of *Legionella micdadei* isolated from hot spring water samples. *Biocontrol Sci*, 14, 181-184. In eng.
- Gaia, V., Casati, S., & Tonolla, M. (2011). Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Syst Appl Microbiol*, 34, 40-44. In eng.
- Gaia, V., Fry, N.K., Afshar, B., Luck, P.C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R., & Harrison, T.G. (2005). Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol*, 43, 2047-2052. In eng.

- Gal-Mor, O., & Segal, G. (2003). The *Legionella pneumophila* GacA homolog (LetA) is involved in the regulation of icm virulence genes and is required for intracellular multiplication in *Acanthamoeba castellanii*. *Microb Pathog*, 34, 187-194. In eng.
- Galan, J.E., & Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, 444, 567-573. In eng.
- Garcia-Fulgueiras, A., Navarro, C., Fenoll, D., Garcia, J., Gonzales-Diego, P., Jimenez-Bunuelas, T., Rodriguez, M., Lopez, R., Pacheco, F., Ruiz, J., Segovia, M., Balandron, B., & Pelaz, C. (2003). Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis*, 9, 915-921.
- Gardel, C.L., & Mekalanos, J.J. (1996). Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect Immun*, 64, 2246-2255. In eng.
- Garduno, R.A. (2007). Life Cycle, growth cycles and developmental cycle of *Legionella pneumophila* In Hoffman, P.S., Friedman, H. & Bendinelli, M. (Eds.), *Legionella pneumophila* (pp. 65-84). Springer US.
- Garduno, R.A., Faulkner, G., Trevors, M.A., Vats, N., & Hoffman, P.S. (1998a). Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 180, 505-513.
- Garduno, R.A., Garduno, E., Hiltz, M., & Hoffman, P.S. (2002). Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun*, 70, 6273-6283. In eng.
- Garduno, R.A., Quinn, F.D., & Hoffman, P.S. (1998b). HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of *Legionella pneumophila*. *Can J Microbiol*, 44, 430-440. In eng.
- Garrity, G.M., Brown, A., & Vickers, R.M. (1980). *Tatlockia* and *Fluoribacter*: Two New Genera of Organisms Resembling *Legionella pneumophila*. *Int J Syst Bacteriol*, 30, 609-614. In english.
- Gaynor, E.C., Cawthraw, S., Manning, G., MacKichan, J.K., Falkow, S., & Newell, D.G. (2004). The genome-sequenced variant of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 and the original clonal clinical isolate differ markedly in colonization, gene expression, and virulence-associated phenotypes. *J Bacteriol*, 186, 503-517. In eng.
- George, J.R., Pine, L., Reeves, M.W., & Harrell, W.K. (1980). Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol*, 11, 286-291. In eng.
- Gerlach, R.G., & Hensel, M. (2007). Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol*, 297, 401-415. In eng.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Gominet, M., Lereclus, D., Wong, A.C., & Senesi, S. (2002). Requirement of *flhA* for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol*, 184, 6424-6433. In eng.
- Gibson, F.C., 3rd, Tzianabos, A.O., & Rodgers, F.G. (1994). Adherence of *Legionella pneumophila* to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can J Microbiol*, 40, 865-872.

- Glick, T.H., Gregg, M.B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W.W., Jr., & Kassanoff, I. (1978). Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol*, 107, 149-160. In eng.
- Glöckner, G., Albert-Weissenberger, C., Weinmann, E., Jacobi, S., Schunder, E., Steinert, M., Hacker, J., & Heuner, K. (2008). Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *Int J Med Microbiol*, 298, 411-428. In eng.
- Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Jarraud, S., Vacherie, B., Rouy, Z., Barbe, V., Medigue, C., Etienne, J., & Buchrieser, C. (2011). Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes. *BMC Genomics*, 12, 536. In eng.
- Gophna, U., Ron, E.Z., & Graur, D. (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*, 312, 151-163. In eng.
- Griffith, M.E., Lindquist, D.S., Benson, R.F., Thacker, W.L., Brenner, D.J., & Wilkinson, H.W. (1988). First isolation of *Legionella gormanii* from human disease. *J Clin Microbiol*, 26, 380-381. In eng.
- Groisman, E.A., & Ochman, H. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell*, 87, 791-794. In eng.
- Hacker, J., & Kaper, J.B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*, 54, 641-679. In eng.
- Hales, L.M., & Shuman, H.A. (1999a). *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect Immun*, 67, 3662-3666.
- Hales, L.M., & Shuman, H.A. (1999b). The *Legionella pneumophila* *rpoS* gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. *J Bacteriol*, 181, 4879-4889. In eng.
- Hall, R.M. (2010). *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiol*, 5, 1525-1538. In eng.
- Hammer, B.K., & Swanson, M.S. (1999). Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol*, 33, 721-731. In eng.
- Hammer, B.K., Tateda, E.S., & Swanson, M.S. (2002). A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*, 44, 107-118.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580. In eng.
- Harb, O.S., Venkataraman, C., Haack, B.J., Gao, L.Y., & Kwaik, Y.A. (1998). Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Appl Environ Microbiol*, 64, 126-132. In eng.

- Harwood, C.S., Fosnaugh, K., & Dispensa, M. (1989). Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior. *J Bacteriol*, 171, 4063-4066. In eng.
- Hawn, T.R., Verbon, A., Lettinga, K.D., Zhao, L.P., Li, S.S., Laws, R.J., Skerrett, S.J., Beutler, B., Schroeder, L., Nachman, A., Ozinsky, A., Smith, K.D., & Aderem, A. (2003). A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*, 198, 1563-1572.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099-1103. In eng.
- Hazelbauer, G.L., Falke, J.J., & Parkinson, J.S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci*, 33, 9-19. In eng.
- Heath, C.H., Grove, D.I., & Looke, D.F. (1996). Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15, 286-290. In eng.
- Hebert, G.A., Moss, C.W., McDougal, L.K., Bozeman, F.M., McKinney, R.M., & Brenner, D.J. (1980). The rickettsia-like organisms TATLOCK (1943) and HEBA (1959): bacteria phenotypically similar to but genetically distinct from *Legionella pneumophila* and the WIGA bacterium. *Ann Intern Med*, 92, 45-52. In eng.
- Hébert, G.A., Steigerwalt, A.G., & Brenner, D.J. (1980). *Legionella micdadei* species nova: Classification of a third species of *Legionella* associated with human pneumonia. *Current Microbiology*, 3, 255-257.
- Heidtman, M., Chen, E.J., Moy, M.Y., & Isberg, R.R. (2009). Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell Microbiol*, 11, 230-248. In eng.
- Helbig, J.H., Benson, R.F., Pelaz, C., Jacobs, E., & Luck, P.C. (2007). Identification and serotyping of atypical *Legionella pneumophila* strains isolated from human and environmental sources. *J Appl Microbiol*, 102, 100-105. In eng.
- Helbig, J.H., König, B., Knospe, H., Bubert, B., Yu, C., Luck, C.P., Riboldi-Tunnicliffe, A., Hilgenfeld, R., Jacobs, E., Hacker, J., & Fischer, G. (2003). The PPIase active site of *Legionella pneumophila* Mip protein is involved in the infection of eukaryotic host cells. *Biol Chem*, 384, 125-137. In eng.
- Helbig, J.H., Lück, P.C., Steinert, M., Jacobs, E., & Witt, M. (2001). Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol*, 32, 83-88.
- Hentschel, W., & Heudorf, U. (2011). [Generally accepted engineering standards and *Legionella* in drinking water : findings from Frankfurt am Main]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 54, 717-723. In ger.
- Herrmann, V., Eidner, A., Rydzewski, K., Bladel, I., Jules, M., Buchrieser, C., Eisenreich, W., & Heuner, K. (2010). GamA is a eukaryotic-like glucoamylase responsible for glycogen- and starch-degrading activity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*. In Eng.

- Heuner, K., & Albert-Weissenberger, C. (2008). The flagellar regulon of *Legionella pneumophila* and the expression of virulence traits. In Heuner, K. & Swanson, M. (Eds.), *Legionella - Molecular Microbiology* (pp. 101-121). Horizon Scientific Press, U. K.
- Heuner, K., Bender-Beck, L., Brand, B.C., Luck, P.C., Mann, K.H., Marre, R., Ott, M., & Hacker, J. (1995). Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (*flaA*) of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Infect Immun*, 63, 2499-2507.
- Heuner, K., Brand, B.C., & Hacker, J. (1999). The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. *FEMS Microbiol Lett*, 175, 69-77.
- Heuner, K., Dietrich, C., Skriwan, C., Steinert, M., & Hacker, J. (2002). Influence of the alternative sigma(28) factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*, 70, 1604-1608.
- Heuner, K., Dietrich, C., Steinert, M., Gobel, U.B., & Hacker, J. (2000). Cloning and characterization of a *Legionella pneumophila*-specific gene encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators. *Mol Gen Genet*, 264, 204-211.
- Heuner, K., Hacker, J., & Brand, B.C. (1997). The alternative sigma factor sigma28 of *Legionella pneumophila* restores flagellation and motility to an *Escherichia coli fliA* mutant. *J Bacteriol*, 179, 17-23.
- Heuner, K., & Steinert, M. (2003). The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *Int J Med Microbiol*, 293, 133-143.
- Hickman, J.W., & Harwood, C.S. (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol*, 69, 376-389. In eng.
- High, A.S., Torosian, S.D., & Rodgers, F.G. (1993). Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a gene (*ompM*) encoding a 25 kDa major outer-membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila*. *J Gen Microbiol*, 139, 1715-1721. In eng.
- Hiltz, M.F., Sisson, G.R., Brassinga, A.K., Garduno, E., Garduno, R.A., & Hoffman, P.S. (2004). Expression of *magA* in *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 is developmentally regulated and a marker of formation of mature intracellular forms. *J Bacteriol*, 186, 3038-3045. In eng.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., & Aizawa, S. (1994). Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 176, 5439-5449. In eng.
- Hirota, N., & Imae, Y. (1983). Na⁺-driven flagellar motors of an alkalophilic *Bacillus* strain YN-1. *J Biol Chem*, 258, 10577-10581. In eng.
- Hizukuri, Y., Kojima, S., Yakushi, T., Kawagishi, I., & Homma, M. (2008). Systematic Cys mutagenesis of FlgI, the flagellar P-ring component of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 154, 810-817. In eng.
- Homma, M., DeRosier, D.J., & Macnab, R.M. (1990a). Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *J Mol Biol*, 213, 819-832. In eng.

- Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T., & Macnab, R.M. (1990b). FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol*, 211, 465-477. In eng.
- Horwitz, M.A. (1983). The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med*, 158, 2108-2126.
- Horwitz, M.A., & Maxfield, F.R. (1984). *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol*, 99, 1936-1943.
- Hovel-Miner, G., Pampou, S., Faucher, S.P., Clarke, M., Morozova, I., Morozov, P., Russo, J.J., Shuman, H.A., & Kalachikov, S. (2009). SigmaS controls multiple pathways associated with intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 191, 2461-2473. In eng.
- Hubber, A., & Roy, C.R. (2010). Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, 261-283. In eng.
- Isberg, R.R., O'Connor, T.J., & Heidtman, M. (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol*, 7, 13-24. In eng.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 5, 987-995. In eng.
- Jacobi, S., Schade, R., & Heuner, K. (2004). Characterization of the alternative sigma factor sigma54 and the transcriptional regulator FleQ of *Legionella pneumophila*, which are both involved in the regulation cascade of flagellar gene expression. *J Bacteriol*, 186, 2540-2547.
- Jain, V., Kumar, M., & Chatterji, D. (2006). ppGpp: stringent response and survival. *J Microbiol*, 44, 1-10. In eng.
- Jepras, R.I., Fitzgeorge, R.B., & Baskerville, A. (1985). A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J Hyg (Lond)*, 95, 29-38. In eng.
- Jones, C.J., Homma, M., & Macnab, R.M. (1987). Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 169, 1489-1492. In eng.
- Jones, G.L., & Hebert, G.A. (1979). '*LEGIONNAIRES' the disease, the bacterium and methodology*. U.S. Department of Health, Education, and Welfare; Public Health Service.
- Jones, J.D., & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329. In eng.
- Josenhans, C., & Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol*, 291, 605-614. In eng.
- Joseph, C.A., & Ricketts, K.D. (2007). From development to success: the European surveillance scheme for travel associated Legionnaires' disease. *Eur J Public Health*, 17, 652-656. In eng.

- Joshi, A.D., Sturgill-Koszycki, S., & Swanson, M.S. (2001). Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the *Legionella pneumophila* phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cell Microbiol*, 3, 99-114.
- Jules, M., & Buchrieser, C. (2007). *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett*, 581, 2829-2838. In eng.
- Kagawa, H., Aizawa, S.I., & Asakura, S. (1979). Transformations in isolated polyhooks. *J Mol Biol*, 129, 333-336. In eng.
- Katz, S.M., Habib, W.A., Hammel, J.M., & Nash, P. (1982). Lack of airborne spread of infection by *Legionella pneumophila* among guinea pigs. *Infect Immun*, 38, 620-622.
- Katz, S.M., & Hammel, J.M. (1987). The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann Clin Lab Sci*, 17, 150-156. In eng.
- Kentner, D., & Sourjik, V. (2006). Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. *Curr Opin Microbiol*, 9, 619-624. In eng.
- Kerwat, K., Just, M., & Wulf, H. (2009). [The German Protection against Infection Act (Infektionsschutzgesetz (IfSG))]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 44, 182-183. In ger.
- Ko, K.S., Hong, S.K., Lee, H.K., Park, M.Y., & Kook, Y.H. (2003). Molecular evolution of the *dotA* gene in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 185, 6269-6277. In eng.
- Ko, K.S., Lee, H.K., Park, M.Y., Park, M.S., Lee, K.H., Woo, S.Y., Yun, Y.J., & Kook, Y.H. (2002). Population genetic structure of *Legionella pneumophila* inferred from RNA polymerase gene (*rpoB*) and DotA gene (*dotA*) sequences. *J Bacteriol*, 184, 2123-2130. In eng.
- Konkel, M.E., Klena, J.D., Rivera-Amill, V., Monteville, M.R., Biswas, D., Raphael, B., & Mickelson, J. (2004). Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol*, 186, 3296-3303. In eng.
- Kozak, N.A., Buss, M., Lucas, C.E., Frace, M., Govil, D., Travis, T., Olsen-Rasmussen, M., Benson, R.F., & Fields, B.S. (2010). Virulence factors encoded by *Legionella longbeachae* identified on the basis of the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968. *J Bacteriol*, 192, 1030-1044. In eng.
- Krinos, C., High, A.S., & Rodgers, F.G. (1999). Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J Appl Microbiol*, 86, 237-244. In eng.
- Kung, V.L., Ozer, E.A., & Hauser, A.R. (2010). The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74, 621-641. In eng.
- La Scola, B., Birtles, R.J., Greub, G., Harrison, T.J., Ratcliff, R.M., & Raoult, D. (2004). *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 699-703. In eng.

- Lacour, S., & Landini, P. (2004). SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J Bacteriol*, 186, 7186-7195. In eng.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. In eng.
- Laguna, R.K., Creasey, E.A., Li, Z., Valtz, N., & Isberg, R.R. (2006). A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18745-18750. In eng.
- Lane, M.C., Alteri, C.J., Smith, S.N., & Mobley, H.L. (2007). Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 16669-16674. In eng.
- Lapidus, I.R., Welch, M., & Eisenbach, M. (1988). Pausing of flagellar rotation is a component of bacterial motility and chemotaxis. *J Bacteriol*, 170, 3627-3632. In eng.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., & Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948. In eng.
- Larsen, S.H., Adler, J., Gargus, J.J., & Hogg, R.W. (1974). Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 1239-1243. In eng.
- Lee, C.A. (1996). Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. *Infect Agents Dis*, 5, 1-7. In eng.
- Lee, V.T., & Schneewind, O. (2001). Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev*, 15, 1725-1752.
- Levi, A., Folcher, M., Jenal, U., & Shuman, H.A. (2011). Cyclic Diguanylate Signaling Proteins Control Intracellular Growth of *Legionella pneumophila*. *MBio*, 2. In eng.
- Levin, A.S. (2009). Nosocomial legionellosis: prevention and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7, 57-68. In eng.
- Lightfield, K.L., Persson, J., Brubaker, S.W., Witte, C.E., von Moltke, J., Dunipace, E.A., Henry, T., Sun, Y.H., Cado, D., Dietrich, W.F., Monack, D.M., Tsolis, R.M., & Vance, R.E. (2008). Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol*, 9, 1171-1178. In eng.
- Liu, R., & Ochman, H. (2007a). Origins of flagellar gene operons and secondary flagellar systems. *J Bacteriol*, 189, 7098-7104. In eng.
- Liu, R., & Ochman, H. (2007b). Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7116-7121. In eng.

- Liu, X., & Matsumura, P. (1994). The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol*, 176, 7345-7351. In eng.
- Liu, X., & Matsumura, P. (1995). An alternative sigma factor controls transcription of flagellar class-III operons in *Escherichia coli*: gene sequence, overproduction, purification and characterization. *Gene*, 164, 81-84. In eng.
- Liu, Y., & Luo, Z.Q. (2007). The *Legionella pneumophila* effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome. *Infect Immun*, 75, 592-603. In eng.
- Lo Presti, F., Riffard, S., Jarraud, S., Le Gallou, F., Richet, H., Vandenesch, F., & Etienne, J. (2000). Isolation of *Legionella oakridgensis* from two patients with pleural effusion living in the same geographical area. *J Clin Microbiol*, 38, 3128-3130. In eng.
- Lück, C. (2011). [*Legionella pneumophila* : genetic diversity of patients and environmental isolates]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 54, 693-698. In ger.
- Lück, P.C. (2008). Diagnostics and Clinical Disease Treatment. In Heuner, K. & Swanson, M. (Eds.), *Legionella: Molecular Microbiology* (pp. 19-34). Norfolk: Caister Academic press.
- Lück, P.C., Hahn, F., Senger, M., Boers, S.A., & Brandsema, P. (2008). European network cooperation to identify hotel as source for pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 2. *Euro Surveill*, 13. In eng.
- Lück, P.C., Jacobs, E., Roske, I., Schroter-Bobsin, U., Dumke, R., & Gronow, S. (2010). *Legionella dresdenensis* sp. nov., isolated from river water. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 2557-2562. In eng.
- Lück, P.C., & Steinert, M. (2006). [Pathogenesis, diagnosis and therapy of *Legionella* infections]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 49, 439-449. In ger.
- Lurie-Weinberger, M.N., Gomez-Valero, L., Merault, N., Glockner, G., Buchrieser, C., & Gophna, U. (2010). The origins of eukaryotic-like proteins in *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*, 300, 470-481. In eng.
- Lynch, D., Fieser, N., Glogglar, K., Forsbach-Birk, V., & Marre, R. (2003). The response regulator LetA regulates the stationary-phase stress response in *Legionella pneumophila* and is required for efficient infection of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Lett*, 219, 241-248. In eng.
- Machner, M.P., & Isberg, R.R. (2006). Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev Cell*, 11, 47-56. In eng.
- Machner, M.P., & Isberg, R.R. (2007). A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science*, 318, 974-977. In eng.
- Macnab, R.M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol*, 57, 77-100. In eng.
- Mahoney, F.J., Hoge, C.W., Farley, T.A., Barbaree, J.M., Breiman, R.F., Benson, R.F., & McFarland, L.M. (1992). Communitywide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine. *J Infect Dis*, 165, 736-739. In eng.
- Majdalani, N., Vanderpool, C.K., & Gottesman, S. (2005). Bacterial small RNA regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 40, 93-113. In eng.

- Mampel, J., Spirig, T., Weber, S.S., Haagensen, J.A., Molin, S., & Hilbi, H. (2006). Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl Environ Microbiol*, 72, 2885-2895. In eng.
- Mandell, L.A., Bartlett, J.G., Dowell, S.F., File, T.M., Jr., Musher, D.M., & Whitney, C. (2003). Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Clin Infect Dis*, 37, 1405-1433. In eng.
- Manson, M.D., Tedesco, P., Berg, H.C., Harold, F.M., & Van der Drift, C. (1977). A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 3060-3064. In eng.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S., & Dixit, V.M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, 430, 213-218.
- Marston, B.J., Lipman, H.B., & Breiman, R.F. (1994). Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med*, 154, 2417-2422. In eng.
- Mattei, P.J., Faudry, E., Job, V., Izore, T., Attree, I., & Dessen, A. (2011). Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J*, 278, 414-426. In eng.
- McCarter, L.L. (2006). Regulation of flagella. *Curr Opin Microbiol*, 9, 180-186. In eng.
- McDade, J.E., Brenner, D.J., & Bozeman, F.M. (1979). Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann Intern Med*, 90, 659-661. In eng.
- McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., & Dowdle, W.R. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med*, 297, 1197-1203. In eng.
- McKinney, R.M., Porschen, R.K., Edelstein, P.H., Bissett, M.L., Harris, P.P., Bondell, S.P., Steigerwalt, A.G., Weaver, R.E., Ein, M.E., Lindquist, D.S., Kops, R.S., & Brenner, D.J. (1981). *Legionella longbeachae* species nova, another etiologic agent of human pneumonia. *Ann Intern Med*, 94, 739-743. In eng.
- Medarov, B.I., Siddiqui, A.K., Mughal, T., Moshiyakhov, M., & Rossoff, L.J. (2004). *Legionella micdadei* infection presenting as severe secretory diarrhea and a solitary pulmonary mass. *Clin Infect Dis*, 38, e63-65. In eng.
- Medini, D., Covacci, A., & Donati, C. (2006). Protein homology network families reveal step-wise diversification of Type III and Type IV secretion systems. *PLoS Comput Biol*, 2, e173. In eng.
- Meyer, R.D., & Finegold, S.M. (1980). Legionnaires' disease. *Annu Rev Med*, 31, 219-232. In eng.
- Miyamoto, H., Maruta, K., Ogawa, M., Beckers, M.C., Gros, P., & Yoshida, S. (1996). Spectrum of *Legionella* species whose intracellular multiplication in murine macrophages is genetically controlled by Lgn1. *Infect Immun*, 64, 1842-1845.

- Moffat, J.F., & Tompkins, L.S. (1992). A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun*, 60, 296-301. In eng.
- Molofsky, A.B., Byrne, B.G., Whitfield, N.N., Madigan, C.A., Fuse, E.T., Tateda, K., & Swanson, M.S. (2006). Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med*, 203, 1093-1104.
- Molofsky, A.B., Shetron-Rama, L.M., & Swanson, M.S. (2005). Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death. *Infect Immun*, 73, 5720-5734.
- Molofsky, A.B., & Swanson, M.S. (2003). *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol Microbiol*, 50, 445-461. In eng.
- Molofsky, A.B., & Swanson, M.S. (2004). Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol*, 53, 29-40.
- Morehouse, K.A., Goodfellow, I.G., & Sockett, R.E. (2005). A chimeric N-terminal *Escherichia coli*--C-terminal *Rhodobacter sphaeroides* FliG rotor protein supports bidirectional *E. coli* flagellar rotation and chemotaxis. *J Bacteriol*, 187, 1695-1701. In eng.
- Morooka, T., Umeda, A., & Amako, K. (1983). Morphological differences in flagella in *Campylobacter fetus* subsp. *intestinalis* and *C. fetus* subsp. *jejuni*. *Microbiol Immunol*, 27, 655-662. In eng.
- Morris, G.K., Steigerwalt, A., Feeley, J.C., Wong, E.S., Martin, W.T., Patton, C.M., & Brenner, D.J. (1980). *Legionella gormanii* sp. nov. *J Clin Microbiol*, 12, 718-721. In eng.
- Mouchtouri, V.A., Goutziana, G., Kremastinou, J., & Hadjichristodoulou, C. (2010). *Legionella* species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures. *Am J Infect Control*, 38, 50-55. In eng.
- Muder, R.R., & Yu, V.L. (2002). Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin Infect Dis*, 35, 990-998. In eng.
- Nagai, H., Kagan, J.C., Zhu, X., Kahn, R.A., & Roy, C.R. (2002). A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science*, 295, 679-682.
- Nagai, H., & Roy, C.R. (2003). Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. *Cell Microbiol*, 5, 373-383.
- Newsome, A.L., Scott, T.M., Benson, R.F., & Fields, B.S. (1998). Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species. *Appl Environ Microbiol*, 64, 1688-1693. In eng.
- Nguyen, L., Paulsen, I.T., Tchieu, J., Hueck, C.J., & Saier, M.H., Jr. (2000). Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2, 125-144. In eng.

- Niehus, E., Gressmann, H., Ye, F., Schlapbach, R., Dehio, M., Dehio, C., Stack, A., Meyer, T.F., Suerbaum, S., & Josenhans, C. (2004). Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 52, 947-961. In eng.
- Niehus, E., Ye, F., Suerbaum, S., & Josenhans, C. (2002). Growth phase-dependent and differential transcriptional control of flagellar genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 148, 3827-3837. In eng.
- Ninio, S., & Roy, C.R. (2007). Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. *Trends Microbiol*, 15, 372-380.
- Nora, T., Lomma, M., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2009). Molecular mimicry: an important virulence strategy employed by *Legionella pneumophila* to subvert host functions. *Future Microbiol*, 4, 691-701. In eng.
- Nyström, T. (2004). Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? *Mol. Microbiol.*, 54, 855-862.
- O'Brien, S.J., & Bhopal, R.S. (1993). Legionnaires' disease: the infective dose paradox. *Lancet*, 342, 5-6. In eng.
- Orrison, L.H., Cherry, W.B., Tyndall, R.L., Fliermans, C.B., Gough, S.B., Lambert, M.A., McDougal, L.K., Bibb, W.F., & Brenner, D.J. (1983). *Legionella oakridgensis*: unusual new species isolated from cooling tower water. *Appl Environ Microbiol*, 45, 536-545. In eng.
- Ott, M., Messner, P., Heesemann, J., Marre, R., & Hacker, J. (1991). Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J Gen Microbiol*, 137, 1955-1961. In eng.
- Ottemann, K.M., & Miller, J.F. (1997). Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol*, 24, 1109-1117. In eng.
- Paget, M.S., & Helmann, J.D. (2003). The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol*, 4, 203. In eng.
- Pallen, M.J., & Matzke, N.J. (2006). From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella. *Nat Rev Microbiol*, 4, 784-790. In eng.
- Palusinska-Szys, M., Choma, A., Russa, R., & Drozanski, W.J. (2001). Cellular fatty acid composition from *Sarcobium lyticum* (*Legionella lytica* comb. nov.)--an intracellular bacterial pathogen of amoebae. *Syst Appl Microbiol*, 24, 507-509. In eng.
- Palusinska-Szys, M., Kalitynski, R., Russa, R., Dawidowicz, A.L., & Drozanski, W.J. (2008). Cellular envelope phospholipids from *Legionella lytica*. *FEMS Microbiol Lett*, 283, 239-246. In eng.
- Payne, N.R., & Horwitz, M.A. (1987). Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med*, 166, 1377-1389.
- Pedro-Botet, M.L., & Yu, V.L. (2009). Treatment strategies for *Legionella* infection. *Expert Opin Pharmacother*, 10, 1109-1121. In eng.
- Penn, C.W., & Luke, C.J. (1992). Bacterial flagellar diversity and significance in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett*, 79, 331-336. In eng.

- Pereira, L.E., Brahmachary, P., & Hoover, T.R. (2006). Characterization of *Helicobacter pylori* sigma54 promoter-binding activity. *FEMS Microbiol Lett*, 259, 20-26. In eng.
- Polesky, A.H., Ross, J.T., Falkow, S., & Tompkins, L.S. (2001). Identification of *Legionella pneumophila* genes important for infection of amoebas by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun*, 69, 977-987. In eng.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., & Levesque, R.C. (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 38-55. In eng.
- Pratt, L.A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*, 30, 285-293. In eng.
- Pruckler, J.M., Benson, R.F., Moyenuddin, M., Martin, W.T., & Fields, B.S. (1995). Association of flagellum expression and intracellular growth of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*, 63, 4928-4932. In eng.
- Rasis, M., & Segal, G. (2009). The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of *Legionella pneumophila* Icm/Dot effectors. *Mol Microbiol*, 72, 995-1010. In eng.
- Ratzow, S., Gaia, V., Helbig, J.H., Fry, N.K., & Luck, P.C. (2007). Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol*, 45, 1965-1968. In eng.
- Reitzer, L., & Schneider, B.L. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65, 422-444, table of contents. In eng.
- Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., & Ramphal, R. (1995). Cloning and phenotypic characterization of *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect Immun*, 63, 4868-4876. In eng.
- Rogers, J., & Keevil, C.W. (1992). Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 58, 2326-2330. In eng.
- Rolig, A.S., Carter, J.E., & Ottemann, K.M. (2011). Bacterial chemotaxis modulates host cell apoptosis to establish a T-helper cell, type 17 (Th17)-dominant immune response in *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 19749-19754. In eng.
- Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol*, 29, 1321-1330. In eng.
- Rossier, O., Dao, J., & Cianciotto, N.P. (2009). A type II secreted RNase of *Legionella pneumophila* facilitates optimal intracellular infection of *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology*, 155, 882-890. In eng.
- Rowbotham, T.J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol*, 33, 1179-1183. In eng.

- Rowbotham, T.J. (1986). Current views on the relationships between *amoebae*, *legionellae* and man. *Isr J Med Sci*, 22, 678-689.
- Roy, C.R., Berger, K.H., & Isberg, R.R. (1998). *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol*, 28, 663-674.
- Ruehleman, S.A., & Crawford, G.R. (1996). Panic in the potting shed. The association between *Legionella longbeachae* serogroup 1 and potting soils in Australia. *Med J Aust*, 164, 36-38. In eng.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., & Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16, 944-945. In eng.
- Sahr, T., Bruggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., & Buchrieser, C. (2009). Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*, 72, 741-762. In eng.
- Saier, M.H., Jr. (2004). Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends Microbiol*, 12, 113-115. In eng.
- Sanger, F., & Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 94, 441-448. In eng.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-5467. In eng.
- Schaefer, B., Brodhun, B., Wischnewski, N., & Chorus, L. (2011). [*Legionella* in drinking water : outcomes of an exchange of ideas on the prevention of waterborne legionellosis]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 54, 671-679. In ger.
- Schulz, T., Rydzewski, K., Schunder, E., Holland, G., Bannert, N., & Heuner, K. (2012). FliA Expression Analysis and Influence of the Regulatory Proteins RpoN, FleQ and FliA on Virulence and *in vivo* Fitness in *Legionella pneumophila* *Archives of Microbiology* - submitted. In english.
- Schunder, E., Adam, P., Higa, F., Remer, K.A., Lorenz, U., Bender, J., Schulz, T., Flieger, A., Steinert, M., & Heuner, K. (2010). Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*, 300, 313-323. In eng.
- Segal, G., Russo, J.J., & Shuman, H.A. (1999). Relationships between a new type IV secretion system and the *icm/dot* virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*, 34, 799-809.
- Selander, R.K., McKinney, R.M., Whittam, T.S., Bibb, W.F., Brenner, D.J., Nolte, F.S., & Pattison, P.E. (1985). Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 163, 1021-1037. In eng.
- Sexton, J.A., & Vogel, J.P. (2002). Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic*, 3, 178-185.
- Sexton, J.A., & Vogel, J.P. (2004). Regulation of hypercompetence in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 186, 3814-3825.

- Shibata, S., Takahashi, N., Chevance, F.F., Karlinsey, J.E., Hughes, K.T., & Aizawa, S. (2007). FlhK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol Microbiol*, 64, 1404-1415. In eng.
- Shimizu, R., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaiharu, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2003). The DeltafliD mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, which secretes flagellin monomers, induces a strong hypersensitive reaction (HR) in non-host tomato cells. *Mol Genet Genomics*, 269, 21-30. In eng.
- Shohdy, N., Efe, J.A., Emr, S.D., & Shuman, H.A. (2005). Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4866-4871. In eng.
- Simms, A.N., & Mobley, H.L. (2008). Multiple genes repress motility in uropathogenic *Escherichia coli* constitutively expressing type 1 fimbriae. *J Bacteriol*, 190, 3747-3756. In eng.
- Smith, K.D., & Ozinsky, A. (2002). Toll-like receptor-5 and the innate immune response to bacterial flagellin. *Curr Top Microbiol Immunol*, 270, 93-108. In eng.
- Soutourina, O.A., & Bertin, P.N. (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 27, 505-523. In eng.
- Spratt, B.G., Hanage, W.P., & Feil, E.J. (2001). The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones. *Curr Opin Microbiol*, 4, 602-606. In eng.
- Springer, N., Ludwig, W., Drozanski, W., Amann, R., & Schleifer, K.H. (1992). The phylogenetic status of *Sarcobium lyticum*, an obligate intracellular bacterial parasite of small amoebae. *FEMS Microbiol Lett*, 75, 199-202. In eng.
- Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol*, 5, 233-241. In eng.
- Stanley, P.M. (1983). Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can J Microbiol*, 29, 1493-1499. In eng.
- Stauffer, L.T., & Stauffer, G.V. (2005). GcvA interacts with both the alpha and sigma subunits of RNA polymerase to activate the *Escherichia coli* *gcvB* gene and the *gcvTHP* operon. *FEMS Microbiol Lett*, 242, 333-338. In eng.
- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C., & Glöckner, G. (2007). *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol*, 297, 577-587.
- Steinert, M., Heuner, K., & Hacker, J. (2001). Legionellosis, a disease transmitted by technical vectors. *Contrib Microbiol*, 8, 12-19.
- Steinert, M., Ockert, G., Lück, C., & Hacker, J. (1998). Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. *Zentralbl Bakteriol*, 288, 331-342.
- Stone, B.J., & Abu Kwaik, Y. (1998). Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun*, 66, 1768-1775.

- Stone, B.J., & Kwaik, Y.A. (1999). Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *J Bacteriol*, 181, 1395-1402. In eng.
- Stout, J.E., & Yu, V.L. (1997). Legionellosis. *N Engl J Med*, 337, 682-687. In eng.
- Sturgill-Koszycki, S., & Swanson, M.S. (2000). *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med*, 192, 1261-1272. In eng.
- Sutterwala, F.S., & Flavell, R.A. (2009). NLRC4/IPAF: a CARD carrying member of the NLR family. *Clin Immunol*, 130, 2-6. In eng.
- Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S.R., & Romeo, T. (2006). Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev*, 20, 2605-2617. In eng.
- Swanson, M.S., & Hammer, B.K. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol*, 54, 567-613.
- Swanson, M.S., & Molofsky, A.B. (2005). Autophagy and inflammatory cell death, partners of innate immunity. *Autophagy*, 1, 174-176.
- Tampakaki, A.P., Fadoulglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J., & Kokkinidis, M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol*, 6, 805-816. In eng.
- Tang, P.W., Toma, S., & MacMillan, L.G. (1985). *Legionella oakridgensis*: laboratory diagnosis of a human infection. *J Clin Microbiol*, 21, 462-463. In eng.
- Tang, P.W., Toma, S., Moss, C.W., Steigerwalt, A.G., Cooligan, T.G., & Brenner, D.J. (1984). *Legionella bozemanii* serogroup 2: a new etiological agent. *J Clin Microbiol*, 19, 30-33. In eng.
- Terashima, H., Kojima, S., & Homma, M. (2008). Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol*, 270, 39-85. In eng.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22, 4673-4680. In eng.
- Thorsted, P.B., Macartney, D.P., Akhtar, P., Haines, A.S., Ali, N., Davidson, P., Stafford, T., Pocklington, M.J., Pansegrau, W., Wilkins, B.M., Lanka, E., & Thomas, C.M. (1998). Complete sequence of the IncPbeta plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. *J Mol Biol*, 282, 969-990. In eng.
- Tiaden, A., Spirig, T., Sahr, T., Walti, M.A., Boucke, K., Buchrieser, C., & Hilbi, H. (2010). The autoinducer synthase LqsA and putative sensor kinase LqsS regulate phagocyte interactions, extracellular filaments and a genomic island of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol*, 12, 1243-1259. In eng.
- Tiaden, A., Spirig, T., Weber, S.S., Bruggemann, H., Bosshard, R., Buchrieser, C., & Hilbi, H. (2007). The *Legionella pneumophila* response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. *Cell Microbiol*, 9, 2903-2920. In eng.

- Toker, A.S., & Macnab, R.M. (1997). Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. *J Mol Biol*, 273, 623-634. In eng.
- Totten, P.A., & Lory, S. (1990). Characterization of the type a flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK. *J Bacteriol*, 172, 7188-7199. In eng.
- Valdez, Y., Ferreira, R.B., & Finlay, B.B. (2009). Molecular mechanisms of *Salmonella* virulence and host resistance. *Curr Top Microbiol Immunol*, 337, 93-127. In eng.
- Velonakis, E.N., Kiouisi, I.M., Koutis, C., Papadogiannakis, E., Babatsikou, F., & Vatopoulos, A. (2010). First isolation of *Legionella* species, including *L. pneumophila* serogroup 1, in Greek potting soils: possible importance for public health. *Clin Microbiol Infect*, 16, 763-766. In eng.
- Vinzing, M., Eitel, J., Lippmann, J., Hocke, A.C., Zahlten, J., Slevogt, H., N'Guessan P, D., Gunther, S., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Flieger, A., Suttorp, N., & Opitz, B. (2008). NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J Immunol*, 180, 6808-6815. In eng.
- von Baum, H., Ewig, S., Marre, R., Suttorp, N., Gonschior, S., Welte, T., & Luck, C. (2008). Community-acquired *Legionella* pneumonia: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*, 46, 1356-1364. In eng.
- von Baum, H., Harter, G., Essig, A., Luck, C., Gonser, T., Embacher, A., & Brockmann, S. (2010). Preliminary report: outbreak of Legionnaires disease in the cities of Ulm and Neu-Ulm in Germany, December 2009 - January 2010. *Euro Surveill*, 15, 19472. In eng.
- Wagner, C., Khan, A.S., Kamphausen, T., Schmausser, B., Unal, C., Lorenz, U., Fischer, G., Hacker, J., & Steinert, M. (2007). Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cell Microbiol*, 9, 450-462.
- Weber, S.S., Ragaz, C., Reus, K., Nyfeler, Y., & Hilbi, H. (2006). *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS Pathog*, 2, e46. In eng.
- Wei, B.L., Brun-Zinkernagel, A.M., Simecka, J.W., Pruss, B.M., Babitzke, P., & Romeo, T. (2001). Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 40, 245-256. In eng.
- Widmer, A., Hohl, P., Dirnhofer, S., Bassetti, S., Marsch, S., & Frei, R. (2007). *Legionella bozemanii*, an elusive agent of fatal cavitary pneumonia. *Infection*, 35, 180-181. In eng.
- Wigneshweraraj, S., Bose, D., Burrows, P.C., Joly, N., Schumacher, J., Rappas, M., Pape, T., Zhang, X., Stockley, P., Severinov, K., & Buck, M. (2008). *Modus operandi* of the bacterial RNA polymerase containing the sigma54 promoter-specificity factor. *Mol Microbiol*, 68, 538-546. In eng.
- Wilkinson, H.W., Thacker, W.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Ampel, N.M., & Wing, E.J. (1985). Second serogroup of *Legionella hackeliae* isolated from a patient with pneumonia. *J Clin Microbiol*, 22, 488-489. In eng.

- Wintermeyer, E., Ludwig, B., Steinert, M., Schmidt, B., Fischer, G., & Hacker, J. (1995). Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. *Infect Immun*, 63, 4576-4583.
- Wolfe, A.J., & Visick, K.L. (2008). Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol*, 190, 463-475. In eng.
- Woo, A.H., Goetz, A., & Yu, V.L. (1992). Transmission of *Legionella* by respiratory equipment and aerosol generating devices. *Chest*, 102, 1586-1590. In eng.
- Wood, T.K., Gonzalez Barrios, A.F., Herzberg, M., & Lee, J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72, 361-367. In eng.
- Wright, E.K., Goodart, S.A., Gowney, J.D., Hadinoto, V., Endrizzi, M.G., Long, E.M., Sadigh, K., Abney, A.L., Bernstein-Hanley, I., & Dietrich, W.F. (2003). Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr Biol*, 13, 27-36.
- Wright, K.J., Seed, P.C., & Hultgren, S.J. (2005). Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization. *Infect Immun*, 73, 7657-7668. In eng.
- Xu, L., Shen, X., Bryan, A., Banga, S., Swanson, M.S., & Luo, Z.Q. (2010). Inhibition of host vacuolar H⁺-ATPase activity by a *Legionella pneumophila* effector. *PLoS Pathog*, 6, e1000822. In eng.
- Yamamoto, Y., Klein, T.W., Newton, C.A., & Friedman, H. (1988a). Interaction of *Legionella pneumophila* with peritoneal macrophages from various mouse strains. *Adv Exp Med Biol*, 239, 89-98. In eng.
- Yamamoto, Y., Klein, T.W., Newton, C.A., Widen, R., & Friedman, H. (1988b). Growth of *Legionella pneumophila* in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice. *Infect Immun*, 56, 370-375. In eng.
- Ye, F., Brauer, T., Niehus, E., Drlica, K., Josenhans, C., & Suerbaum, S. (2007). Flagellar and global gene regulation in *Helicobacter pylori* modulated by changes in DNA supercoiling. *Int J Med Microbiol*, 297, 65-81. In eng.
- Young, G.M., Schmiel, D.H., & Miller, V.L. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6456-6461. In eng.
- Yssel, A., Reva, O., & Tastan Bishop, O. (2011). Comparative structural bioinformatics analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* chemotaxis proteins within *Bacillus subtilis* group. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92, 997-1008. In eng.
- Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C.M., Paterson, D.L., & Cheresky, A. (2002). Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis*, 186, 127-128. In eng.

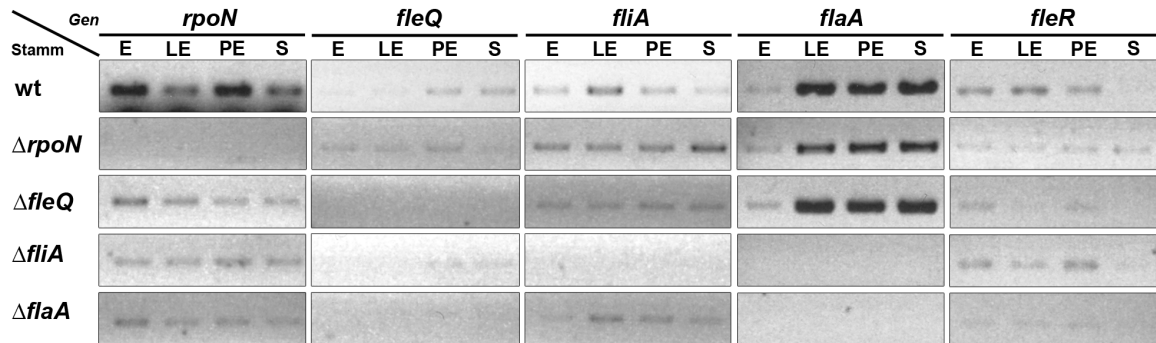
Zhu, W., Banga, S., Tan, Y., Zheng, C., Stephenson, R., Gately, J., & Luo, Z.Q. (2011). Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*. *PLoS One*, 6, e17638. In eng.

Zusman, T., Gal-Mor, O., & Segal, G. (2002). Characterization of a *Legionella pneumophila relA* insertion mutant and roles of RelA and RpoS in virulence gene expression. *J Bacteriol*, 184, 67-75. In eng.

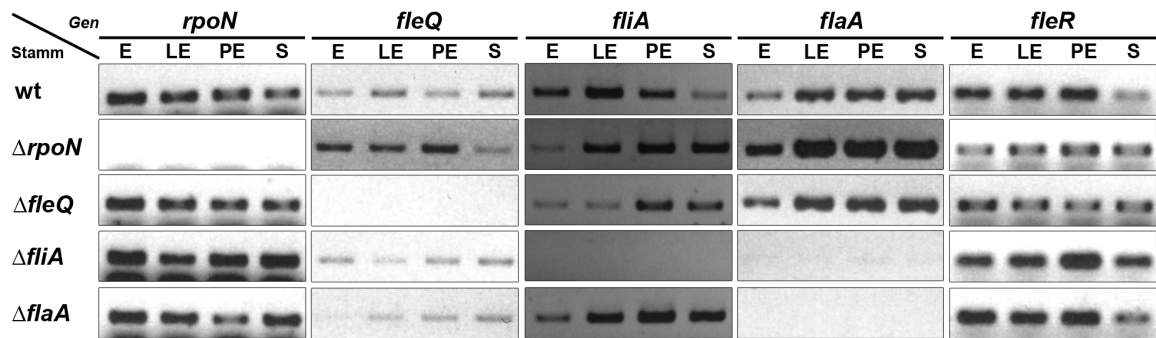
Anhang

Transkriptionelle Untersuchung von *Lp* Corby (RT-PCR mit allen Zyklen)

A 24 Zyklen



B 27 Zyklen



C 30 Zyklen

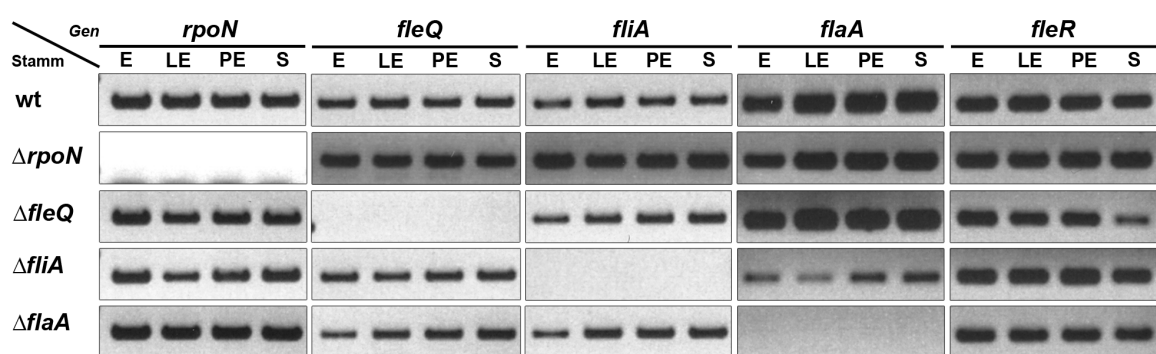


Abb. 63: Reverse Transkriptase (RT-) PCR Untersuchungen verschiedener Gene von *L. pneumophila* Corby und Mutantenstämmen. Aus Flüssigkulturen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und den entsprechenden Wachstumsumsphasen Proben entnommen und für die RT-PCR Analysen vorbereitet. Für RT-PCR Versuche wurde Gesamt-Zell RNA isoliert und anschließend gleiche Mengen (10 ng) für die Amplifikation genutzt. Die RT-PCR wurde mit (A) 24, (B) 27 und (C) 30 Zyklen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in mindestens 2 unabhängigen Experimenten bestätigt. Abkürzungen: E, exponentielle Wachstumsphase; LE, spät exponentielle Wachstumsphase; PE, post exponentielle Wachstumsphase; S, stationäre Wachstumsphase.

ClustalW-Alignment mit *fleQ*-Promotorsequenzen von *Legionella*

Die folgenden Abschnitte zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten *Alignments* mit dem Programm *ClustalW*. Von den hier untersuchten *Legionella* Stämmen wurden dazu die 200 bp *upstream* des Startkodons extrahiert und mit *ClustalW* untersucht. Grün dargestellt ist jeweils das Startkodon, Gelb die Ribosomenbindestelle und die jeweilige Sigmafaktor-Bindestelle in rosa bzw. blau.

Für den Promotorbereich von *fleQ* waren zwei verschiedene σ^{70} (RpoD) Bindestellen bekannt (Jacobi et al. 2004). Die erste *fleQ* t₁ ist rosa dargestellt und die zweite *fleQ* t₂ in blau. Beide Bereiche sind ineinander verschachtelt.

LpC_fleQ_Prom	-----AAATCAAAT	9
LpP_fleQ_Prom	-----AAATCAAAT	9
LpL_fleQ_Prom	-----GATAAAATCAAAC	12
LpPhil_fleQ_Prom	-----GATAAAATCAAAT	12
LpAlc_fleQ_Prom	-----GATAAAATCAAAT	12
LpTogus_fleQ_Prom	-----GATAAAATCAAAC	12
LLAP10_fleQ_Prom	-----CGGCAA-TCA---	9
LLAP12_fleQ_Prom	GTTGTGGTTTACGCGCCGCTAATTCATTTGTAGTCGCATGGGTTTATACAAGCTAAGC	60
Lmic_fleQ_Prom	-----AC-----CCGCTACTAAGAC	15
Lhack_fleQ_Prom	-----ACATTGCGGCTACTAAAGC	19
Lboze_fleQ_Prom	-----ATTATGCAGGCTAAGT	17
Lgorm_fleQ_Prom	-----TTATATACAAGCGAAGC	17
Llong_fleQ_Prom	-----TCATACGGGCTAAAT	15
	*	
LpC_fleQ_Prom	ACTTAGTCTGGTGATGACTATGATTTTT--TA--A--TTAGCA-----TCCGGATAGGT	57
LpP_fleQ_Prom	ACTTAGTCTGGTGATGACTATGATTTTT--TA--A--TTAGCA-----TCCGGATAGGT	57
LpL_fleQ_Prom	ACTTAGTCTGGTGATGACTATGATTTTT--TA--A--TTAGTG-----TCAGGATAGGT	60
LpPhil_fleQ_Prom	ACTTAGTCTGGTGATGACTATGATTTTT--TA--A--TTAGCA-----TCCGGATAGGT	60
LpAlc_fleQ_Prom	ACTTAGTCTGGTGATGACTATGATTTTT--TA--A--TTAGCA-----TCCGGATAGGT	60
LpTogus_fleQ_Prom	ACTTAGTCTGGTGATGATTTATGATTTTT--TA--A--TTAGCA-----CTGGATAGGT	60
LLAP10_fleQ_Prom	ATGTAATGCATTTAAATATGATGTTTGT--TACAG--ATAATAAAGGGCTTCAGACAGTT	65
LLAP12_fleQ_Prom	ATTTTGTTAA--AGAAACACAAGTAAGT-----GCAAC-----TCAGAGC-AT	100
Lmic_fleQ_Prom	TCTTGG-GAATCAAAAAGCTGTGTTTGGG-CACCAATGTAACGCA----TTCGAATACAT	69
Lhack_fleQ_Prom	AATAGG-GAACCAAAAAGCTATGTTTGGGAATAGCA-TGTAACGCT----TTTGAACATAT	73
Lboze_fleQ_Prom	ATTTTGTGAA--AGAAACCCAGGTAAGT-----GCGAC-----TAAACA-AT	57
Lgorm_fleQ_Prom	ATTTTGTGAA--AGAAACTCAGGTAAGT-----GCAAC-----CAAAACA-AT	57
Llong_fleQ_Prom	CCTTTGTAA--AGAAACCAAGTAGGC-----GCTAC-----TAAACA-AT	55
	* *	
LpC_fleQ_Prom	TA-GTATTTTTTTAATTATAGCGATACGGCCTAATTGATAGATTTTATGACGGTTAAAA	116
LpP_fleQ_Prom	TA-GTATTTTTTTAATTATAGCGATACGGCCTAATTGATAGATTTTATGACGGTTAAAA	116
LpL_fleQ_Prom	TA-GTATTTTTTTAATTATAGCGATACGGCCTAATTGATGGATTTTATGACGATTTAAAA	119
LpPhil_fleQ_Prom	TA-GTATTTTTTTAATTATAGCGATACGGCCTAATTGATAGATTTTATGACGGTTAAAA	119
LpAlc_fleQ_Prom	TA-GTATTTTTTTAATTATAGCGATACGGCCTAATTGATAGATTTTATGACGGTTAAAA	119
LpTogus_fleQ_Prom	TA-GTATTTTTTTAATTATAGCGATACGGCCTAATTGATAGATTTTATGACGGTTAAAA	119
LLAP10_fleQ_Prom	C---TGTTACCTTGGC-ATAA--ATATAATTTAGT--GATAT-TTTTATGACGGTTGCAT	116
LLAP12_fleQ_Prom	TGGCAGCCA-----GGAGTTATGTTTGGTA--ATCAATGTAATG-CATTTAAAA	147
Lmic_fleQ_Prom	CACATGCTACCGT-----TAGCAAGGT--TTGGTGT-ATAGATTG-ATGACGCTTGGAT	120
Lhack_fleQ_Prom	TGATTGTTACCGC-----TAG-GGCAT--GTGAATATTAAGGATTT-CTGACGCGAAGAA	124
Lboze_fleQ_Prom	TGGTAGCCA-----GGAATTGTGTTTCGGGA--ATCAGTGTAATG-CGTTTTCAT	104
Lgorm_fleQ_Prom	TGGTAGTCA-----GGAGTTGTGTTTGGAA--ATAAGTGCAATG-CGTTTAAAT	104
Llong_fleQ_Prom	AGGAAGTGA-----GGAGTTATGTTTGGTA--ATCTATGTAATG-CGTTTAAAA	102
	* * * *	

LpC_fleQ_Prom	TAAATTG-TGACAATTATTTGACAGTTATT CATTATGTGTCCGA-----TACTT-----	164
LpP_fleQ_Prom	TAAATTG-TGACAATTATTTGACAGTTATT CATTATGTGTCCGA-----TACTT-----	164
LpL_fleQ_Prom	TAAATTG-TGACAATTATTTGACAGTTATT CATTATGTGTCCGA-----TACTT-----	167
LpPhil_fleQ_Prom	TAAATTG-TGACAATTATTTGACAGTTATT CATTATGTGTCCGA-----TACTT-----	167
LpAlc_fleQ_Prom	TAAATTG-TGACAATTATTTGACAGTTATT CATTATGTGTCCGA-----TACTT-----	167
LpTogus_fleQ_Prom	TAAATTG-TGACAATTATTTGACAGTTATT CATTATGTGTCCGA-----TACTT-----	167
LLAP10_fleQ_Prom	TTATTAAATGTCATGGATTTGACAGATGTTAATTAGTGTCCAA-----TATTTAT---	167
LLAP12_fleQ_Prom	TAATAGTTTGTATCGCTAAGCCATATTATT-----TT-----	180
Lmic_fleQ_Prom	AAAAAAA-CGTCATGGATTTGACAGAAATATTAGTTAGTAACCAA-----TACTCA----	169
Lhack_fleQ_Prom	AAAAGGT-CGTCATTTATTTGACAGGCTAACGGTTAGTAACCTAA-----TACTCA----	173
Lboze_fleQ_Prom	TAATCGTGTGTTATCGATAGGTTA-ATTATTGAAATCTTTCCT-----CGATTTAAGG	156
Lgorm_fleQ_Prom	TAATCGTGTGTTATCGATAG-TGA-ATTATTGAACTCTT-CCT-----CGCTTTTGGGA	154
Llong_fleQ_Prom	CGATAGTGTGTTATCGATAATTTA-ATTATTGGA-TTGTTTCCTACTATATTAATTATAAG	160
	* * * * *	
LpC_fleQ_Prom	--TAAATTAATGACTC-----AACTTAAGGATAGGTTTATG	200
LpP_fleQ_Prom	--TAAATTAATGACTC-----AACTTAAGGATAGGTTTATG	200
LpL_fleQ_Prom	--TAAATTAATGACTC-----AACTTAAGGATAGGTTTATG	203
LpPhil_fleQ_Prom	--TAAATTAATGACTC-----AACTTAAGGATAGGTTTATG	203
LpAlc_fleQ_Prom	--TAAATTAATGACTC-----AACTTAAGGATAGGTTTATG	203
LpTogus_fleQ_Prom	--TAAATTAATGACTC-----AACTTAAGGATAGGTTTATG	203
LLAP10_fleQ_Prom	--TAAGATAAACATCTC-----AACCTTAAGGATGGGTTTATG	203
LLAP12_fleQ_Prom	-----GAT-----AAGTTAAGGATAGGTTTATG	203
Lmic_fleQ_Prom	---ACATTAGACGATAT-----ACGGACAGGGATCAGCT-ATG	203
Lhack_fleQ_Prom	---AT-TTAGATAA-GT-----CGGGTAGGGAT-AGCT-ATG	203
Lboze_fleQ_Prom	-GAGAGAATGATGGTGGCAAGTATATAAAACCTTAAGGATAGGTTTATG	203
Lgorm_fleQ_Prom	AGAAAGAATGATGGTGCAGGTATATAAAACCTTAAGGATAGGTTTATG	202
Llong_fleQ_Prom	AGAAAGAGAGAGGATTATAA----AGTAAGCTTAAGGATAGGTTTATG	203
	* * * * *	

ClustalW-Alignment mit *fleS*-Promotorsequenzen von *Legionella*

Für den Promotorbereich von *fleS* waren eine σ^{70} (RpoD, blau) und eine σ^{54} (RpoN, rosa) Bindestelle beschrieben (Albert-Weissenberger et al. 2010). Beide Bereiche liegen hintereinander.

LpC_fleS_Prom	-----GACTGTAG---GAA-GCAAGGATGATTC---TTT---GAAATCT---CC	36
LpP_fleS_Prom	CAAAATTCTGACTGTAG---GAA-GCATGGATGATTC---TTT---AAAATCT---CC	45
LpL_fleS_Prom	CAAAATTCTGACTGTAG---GAA-ACATGGATGATTC---TTT---AAAATCT---CC	45
LpPhil_fleS_Prom	CAAAATTCTGACTGTAG---GAA-GCAAGGATGATTC---TTT---GAAATCT---CC	45
LpAlc_fleS_Prom	-----GACTGTAG---GAA-GCAAGGATGATTC---TTT---GAAATCT---CC	36
LpTogus_fleS_Prom	-----ACTGTAG---GAAAGCATGGATGATTC---TTT---AAAATCT---CC	36
LLAP10_fleS_Prom	-----CCTGATTGTGG---TAC-----TGTGCCTC---CTTCGAGAGGCATGATGCC	41
LLAP12_fleS_Prom	-----AATAAATA-----ATTGTAAT---ATTTTAGGCATCGTGAATT	35
Lmic_fleS_Prom	-----CGTGTGGGAA-----GAATGCTATTA---TCTATGGGCGTACCA---AT	38
Lhack_fleS_Prom	-----AATTATGA-----ATATACAACCT-----CAAAAATG-CAAAAT	33
Lboze_fleS_Prom	-----TCAT-TTGTGG---TAA---GCATGTTAGTAGCATATTAGGCAGTAATAATAT	46
Lgorm_fleS_Prom	---TATTTCATATTGCGACGCATAATTGGCATAAACTACTATTTTGATTAATT-TAATAT	56
Llyti_fleS_Prom	-----TCCTCT-----CTAGCACTC---ATCCAAACCATCACATTTT	34
Llong_fleS_Prom	-----AATAAATA-----TTTGGGTATTCCAGGAT	24
	*	
LpC_fleS_Prom	TTAACCCAAGTTACAATGATTTAAAAAT-TACAA-----ATTGTTTATATTTT-----	84
LpP_fleS_Prom	TTAACCCCATTTACAATGATTTAAAAAT-TACAA-----ATTGTTTATATTTT-----	93
LpL_fleS_Prom	TTAACCCCATTTACAATGATTTAAAAAT-TACAA-----ATTGTTTATATTTT-----	93
LpPhil_fleS_Prom	TTAACCCAAGTTACAATGATTTAAAAAT-TACAA-----ATTGTTTATATTTT-----	93
LpAlc_fleS_Prom	TTAACCCAAGTTACAATGATTTAAAAAT-TACAA-----ATTGTTTATATTTT-----	84
LpTogus_fleS_Prom	TTAACCCCATTTACAATGATTTAAAAAT-TACAA-----ATTGTTTATATTTT-----	84
LLAP10_fleS_Prom	TTAAGCC-----TAAAGCATAAAAACATATTT-----ATTGATACAGTAATGG----	86
LLAP12_fleS_Prom	TTATTAACCGTTTATTGGCGAAAAGT---GCCT-----GGTGTGT-TAACGATTC----	82
Lmic_fleS_Prom	ACAATAATAAG-GAAAAAGGATAAACAAATGGCTTGCTAAAGTCGTTGAAATTTATCGG-	96
Lhack_fleS_Prom	TAAATATCAT-TAAATTGAGTTAATTAATATTT-----GA--TCT-CATTGTTCG----	80
Lboze_fleS_Prom	CAAGTAAAAA-TACATTATGCATAA-----ATTT-----AT--TTA-TAATATC-----	86
Lgorm_fleS_Prom	CAA-TATTAT-T--ATCATGGTTAAT---ATTT-----CT--TGT-CAATA-----	92
Llyti_fleS_Prom	TTAATATAAA---ATAAACGATAAAA---GCTT-----AA-ATCC-TATTTATTTTCT	80
Llong_fleS_Prom	TGTAAGTAAGGTGTGTTGAC---AATTCATCCCC---AGCGTCT-GGATGCCGCAAAAC	75
	**	

```

LpC_fileS_Prom      -----AAATACATTC-AAAAAAA---TCTGGTTTTCAATTGGT--TAATTAATTGATTTC 133
LpP_fileS_Prom      -----AAATACATTC-AAAAAAA---TTTGGTTTTCAATTGGT--TAATTAATTGATTTC 142
LpL_fileS_Prom      -----AAATACATTC-AAAAAAA---ACTGGTTTGCAATTGGT--TAATTAATTGATTTC 142
LpPhil_fileS_Prom   -----AAATACATTC-AAAAAAA---TCTGGTTTTCAATTGGT--TAATTAATTGATTTC 142
LpAlc_fileS_Prom    -----AAATACATTC-AAAAAAA---TCTGGTTTTCAATTGGT--TAATTAATTGATTTC 133
LpTogus_fileS_Prom  -----AAATATATTC-AAAAAAA---TCTGGTTTGCAATTGGT--TAATTAATTGATTTC 133
LLAP10_fileS_Prom   -----AAGAATAACA-AAAGGAAC-ATTTATTATTCAATT-----TAATCAATGATTTT 134
LLAP12_fileS_Prom   --GCCTTATA-AATG-ATTTATC--AATAGGTATTTAAA--AC--TAATTGACTGATTTT 132
Lmic_fileS_Prom     -----GCGCGAAATGCAAAGATGAGAATTGCCAACAGATATAGACTAATTATCTGATAT 151
Lhack_fileS_Prom    ----TAAATATAACA-TACTCG--TCTCTTGCTTTATT--GT--TAATTCCATGATTTT 129
Lboze_fileS_Prom    -----AAATGCAAGA-AAGAAAA--AATGGAGTTTG---AT--TAATTGTATGATTTT 132
Lgorm_fileS_Prom    -----AAAT--AAGC-AATGTTG--ATTTAAGT---A---AT--TAATTGCATGATTTT 133
Llyti_fileS_Prom    GTGCTTTGTTCAATT-AATAATC--ACAGAACATTTAAA--AA--TAATTCTATGATTTT 133
Llong_fileS_Prom    AAGTCGTGGTCCGTA-GGTGGTGGGATGAATTGTCAATATGTCTTAATTACATACTTT 134

```

***** * * *

```

LpC_fileS_Prom      AAAT-ACATTTTAATTTTGGCCTGAACTTTGCTAGAGACATTTTCATA---ATAATAATTA 189
LpP_fileS_Prom      AAAT-ACATTTTAATTTTGGCCTGAACTTTGCTAGAGACATTTTCATA---ATAATAATTA 198
LpL_fileS_Prom      AAAT-ACATTTTAATTTTGGCCTGAACTTTGCTAGAGACATTTTCATA---ATAATAATTA 198
LpPhil_fileS_Prom   AAAT-ACATTTTAATTTTGGCCTGAACTTTGCTAGAGACATTTTCATA---ATAATAATTA 198
LpAlc_fileS_Prom    AAAT-ACATTTTAATTTTGGCCTGAACTTTGCTAGAGACATTTTCATA---ATAATAATTA 189
LpTogus_fileS_Prom  AAAT-ACATTTTAATTTTGGCCTGAACTTTGCTAGAGACATTTTCATA---ATAATAATTA 189
LLAP10_fileS_Prom   AATC-ACATTTTCATTT-GACTCAAAGTTTGTTAGAGTCAATATATGTAGGCAAAA--A 190
LLAP12_fileS_Prom   AAAA-GCATTTTCATTTCTTAAAAAAATTTGTTACAGTCATTGAT-ATCCGT-GTAATCA 189
Lmic_fileS_Prom     ATTT-ATATTTTAATTT-----TAGGTTCTATCAAAGCATT-----TAAGGC 193
Lhack_fileS_Prom    TAGTTACATTTTTAATTTTGTTATAAAATTTTGTTAAAGTCGT---A-AGTAG--AAAAAAC 183
Lboze_fileS_Prom    AAAT-ATATTTTCATTTTACTCTAAATTT-GTTACAGTCATCTTA-ATTAATTAAAAATA 189
Lgorm_fileS_Prom    AAAT-GTATTTTCATTTTATTCTAAATTT-GCTACAGTGATCT-A-ATTAATTATAATA 189
Llyti_fileS_Prom    AAAA-GCATTTGCTTTCTATTTAAAAATTTGTTACAGTCCTTAG--ATTCGT-ATAATCA 189
Llong_fileS_Prom    TAG--ATATTTTCATTTGAATCTAAA-TTTGTTAGAGTCAAT--AAATTAATTATAATA 189

```

*** * *** * * **

```

LpC_fileS_Prom      AAATGAATAAC-----ATG 203
LpP_fileS_Prom      AAATG----- 203
LpL_fileS_Prom      AAATG----- 203
LpPhil_fileS_Prom   AAATG----- 203
LpAlc_fileS_Prom    AAATGAATAAC-----ATG 203
LpTogus_fileS_Prom  AAATGAATGAC-----ATG 203
LLAP10_fileS_Prom   AAACGTATT-T-----ATG 203
LLAP12_fileS_Prom   TAACGTCCAGT-----ATG 203
Lmic_fileS_Prom     CAATATT-----ATG 203
Lhack_fileS_Prom    TATCAACCAGTGGGTACATG 203
Lboze_fileS_Prom    TTTTCATCCAGT-----ATG 203
Lgorm_fileS_Prom    TTTTCATCCAGT-----ATG 203
Llyti_fileS_Prom    TAATGTCCAGT-----ATG 203
Llong_fileS_Prom    TTTTCATCTAGC-----ATG 203

```

ClustalW-Alignment mit *fliM*-Promotorsequenzen von *Legionella*

Für *fliM* wurde eine σ^{54} (RpoN) Bindestelle mit einer -24 und einer -12 Box vermutet (Albert-Weissenberger 2008) und konnte hier in verschiedenen *Legionella* Stämmen gezeigt werden.

LpC_fliM_Prom	-----TCGAATTAAATGAGCTAATCAAGGGT--T	27
LpP_fliM_Prom	-----TCGAATTAAATGAGCTAATCAAGAGT--T	27
LpL_fliM_Prom	-----TCGAATTAAATAAGCTAATCAAGGGT--T	27
LpPhil_fliM_Prom	-----GTCTAATTAAATGAGCTAATCAAGATT--T	28
LpAlc_fliM_Prom	-----GTCTAATTAAATGAGCTAATCAAGATT--T	28
LpTogus_fliM_Prom	-----TCGAATTAAATGAGCTAATCAAGGGT--T	27
LLAP10_fliM_Prom	-----TCATTTTAAATATGTCAAATTAGAATGCT	29
LLAP12_fliM_Prom	-----ATCTTATCTTTGTCA-----AAT--C	19
Lmic_fliM_Prom	-----GCATGACTAAAATGGAAAATT--GCTTAT	28
Lhack_fliM_Prom	-----TTTTTTTCAACAAGCGAAAT--GGT--T	23
Lboze_fliM_Prom	-----ATGATTGGCATAACGATTTTGTGA--CTGTCA-----AAC--C	33
Lgorm_fliM_Prom	-----GTAAATACCTCA--ATTTTTCAGCATTGTTGCTT--GGAT--C	38
Llyti_fliM_Prom	GTTCGTTTTCTATTACAGTTATTTACTAATAAAAGTCTATTTTTGTGA-----ACT--C	52
	* *	
LpC_fliM_Prom	GATTATTACACTATCTATTTTATTTATTGACA----TATTTTCATGGATGGCATGGGC-TT	82
LpP_fliM_Prom	GATTATTACACTATCTATTTGATTTATTGATA----TATTTTCATGGATGGCATGGGC-TT	82
LpL_fliM_Prom	GATTATTACACTATCTATTTGATTTATTGATA----TATTTTCATGGATGGCATGGGC-TT	82
LpPhil_fliM_Prom	GATTATTACACTATCTATTTGATTTATTGATA----TATTTCTTGGATGGGCATGGGC-TT	83
LpAlc_fliM_Prom	GATTATTACACTATCTATTTGATTTATTGATA----TATTTCTTGGATGGGCATGGGC-TT	83
LpTogus_fliM_Prom	GATTATTACACTATCTATTTGATTTATTGATA----TATTTTCATGGATGGCATGGGC-TT	82
LLAP10_fliM_Prom	GAATATGAAGCATGCTATT-GATTTATCACTA----TATTTTAAATCTGGCATGATA-TT	83
LLAP12_fliM_Prom	ATTGACGAAAACCATCTAGGTTATGTCAAATTAT-TAG--AAGTGGATAAGACAGGCCCTT	75
Lmic_fliM_Prom	TTTTACTGAGCATGTCACATTACTTCAAGCGA----ACTCCTTAAAGTTGGCAGGTGTG	84
Lhack_fliM_Prom	CTACACCAAGAACCTTGTGA-AATATATCGTTGATCCTATTGACTAAACG-CATCGG--T	78
Lboze_fliM_Prom	A--GCACATCACTTTTCCCATTTATAAATCGAGAGATATATTAGA-----GATTATG	84
Lgorm_fliM_Prom	AA-GGCGCAAACCCAAATCCAGGCTTCAATTC-----TACTAGA-----AAT--	79
Llyti_fliM_Prom	ATTGACGAGGCCCTCTTTTATGTCAAATTGCGTAGTCTAAATGGAT---CAGCTGTT	108
	*	
LpC_fliM_Prom	TGCAATAACATAACCATTCTATAGTTGTTACTGATGGATTG--AGCTAATTTTAA-----	135
LpP_fliM_Prom	TGCAATAACATAACCATTCTATAGTTGTTACTGATGGATTG--AGCTAATTTTAA-----	135
LpL_fliM_Prom	TGCAATAACATAACCATTCTATAGTTGTTACTGATGGATTG--AGCTAATTTTAA-----	135
LpPhil_fliM_Prom	TGCAATAACATAACCATTCTATAGTTGTTACTGATGGATTG--AGCTAATTTTAA-----	136
LpAlc_fliM_Prom	TGCAATAACATAACCATTCTATAGTTGTTACTGATGGATTG--AGCTAATTTTAA-----	136
LpTogus_fliM_Prom	TGCAATAACATAACCATTCTATAGTTGTTACTGATGGATTG--AGCTAATTTTAA-----	135
LLAP10_fliM_Prom	TGCTTAGA-AAGACTATTGGGTA-TGATTATTTATTTTATA--AGCTAATTTTCACT---	136
LLAP12_fliM_Prom	TGATTTAAATATAATTTTTTATATGGCATGATTTTGCATATAAAGCGATTTA-----	128
Lmic_fliM_Prom	CAGTCAATGATGACAACCTTAGGAATTATTTGAATTTGGCATA-----CATTTGCTT---	135
Lhack_fliM_Prom	TGTTTCGACAGTAAAGA---ATAGC--TTATTGATAAAATAC-AG--GATTTTGGCACGT	129
Lboze_fliM_Prom	TAAT--AAGCACATTTTATAAATGGCATATAGTTTGCAT--AAGCCTATTCAATA---	136
Lgorm_fliM_Prom	-GAC--AAGGCCATTTT-ATAAATGGCATATAGTTTGCAT--AAGGCTATTCAATA---	129
Llyti_fliM_Prom	TGATTTTAAATTAATTTTAA-AAAATATGCAATTTGCATAGAAA--CATC-----	156
	* * * * *	
LpC_fliM_Prom	--ACTAATCAACCCT-TCAATTTTAA--AATAACTTTGAAAAA-----TCTGGT---TG-	181
LpP_fliM_Prom	--ACTAATCAACCCT-TCAATTTTAA--AATAACTTTGAAAAA-----TCTGGT---TG-	181
LpL_fliM_Prom	--ACTAATCAACCCT-TCAATTTTAA--AATAACTTTGAAAAA-----CCTGGT---TG-	181
LpPhil_fliM_Prom	--ACTAATCAACACT-TCAATTTTAA--AATAACTTTGAAAAA-----TCTGGT---TG-	181
LpAlc_fliM_Prom	--ACTAATCAACACT-TCAATTTTAA--AATAACTTTGAAAAA-----TCTGGT---TG-	181
LpTogus_fliM_Prom	--ACTAATCAACCCT-TCAATTTTAA--AATAACTTTGAAAAA-----TCTGGT---TG-	181
LLAP10_fliM_Prom	--ATTAATTGAACCT-TAAATCTCAA--GATGAATTGGATTAA-----TGGTG--TC-	181
LLAP12_fliM_Prom	-GAAAAACAATTAAGTCTGTGTGTA--CTTGAATTTAATGGTTGAGTTCAGGT--ATTG	183
Lmic_fliM_Prom	--ATGCCTCGAAGGC---CATTTGTAACCATGGCCCTTAAACAA-----TAGCG--CT-	180
Lhack_fliM_Prom	CATTTGCTTATGCCA-TGCGTGCAAT--TATAAGTATAGCTAA-----AGTAGCAAAC-	180
Lboze_fliM_Prom	-GAAAAATCA-----TGATGCTTA--CTTGAATGGAATAA-----GTGAAT--	174
Lgorm_fliM_Prom	-GAAAAATCA-----TGATGCTTA--CTTGAATTTAATGA-----GTAACTT	169
Llyti_fliM_Prom	--AAAAAACG-----GTA-----TTGAATTTTA-----GT--ATTT	183
	* *	

```

LpC_fliM_Prom      -----AGATG-CGAATGGATTGCTTATG-- 203
LpP_fliM_Prom      -----AGATG-CGAATGGATTGCTTATG-- 203
LpL_fliM_Prom      -----AGATG-CGAATGGATTGCTTATG-- 203
LpPhil_fliM_Prom   -----AGATG-CGAATGGATTGCTTATG-- 203
LpAlc_fliM_Prom    -----AGATG-CGAATGGATTGCTTATG-- 203
LpTogus_fliM_Prom  -----AGATG-CGAATGGATTGCTTATG-- 203
LLAP10_fliM_Prom   -----AGAGG-CGAATGGACTGCTTATG-- 203
LLAP12_fliM_Prom   -----GATAGTATGGATTACTTATG-- 203
Lmic_fliM_Prom     -----ATAAAAATAATGAGAAAATTATG-- 203
Lhack_fliM_Prom    -----AGAGCTCTTACAGGAAGTTATG-- 203
Lboze_fliM_Prom    -----AAAATTAGTATGGATTGCTTATATG 199
Lgorm_fliM_Prom    CAAGTTCAAAAAATTGTATGGATTGCTTATATG 203
Llyti_fliM_Prom    -----TTTAGTATGGATTGCTTATG-- 203
                    *          ***

```

ClustalW-Alignment mit *flhF*-Promotorsequenzen von *Legionella*

In dieser Arbeit konnte der Transkriptionsstartpunkt für *flhF* bestimmt werden und zeigte eine mögliche σ^{54} (RpoN) Bindestelle mit einer -24 und einer -12 Box (rosa, Kapitel 4.3.6). *Downstream* des -12 Elements konnte eine weitere mögliche -10 Box (unterstrichen) gefunden werden.

```

LpC_flhF_Prom      -----ACAGGCAAAG-----CAGGAGAGCTCAGT 24
LpP_flhF_Prom      -----ACAGGCAAAG-----CAGGAGAGCTCAGT 24
LpL_flhF_Prom      -----ACAGGCAAAG-----CAGGAGAGTTCAGT 24
LpPhil_flhF_Prom   -----AATCCAGTTCGCTGCACAACAACAGGCAAAG-----CAGGAGAGCTCAGT 45
LpAlc_flhF_Prom    -----ACAGGCAAAG-----CAGGAGAGCTCAGT 24
LpTogus_flhF_Prom  -----GCAAGCAAAA-----CAGGAGAGCTCAGT 24
LLAP10_flhF_Prom   -----CACAGTTTGTCTGCACAACAGCAATCCAAA-----CAAGAAAGCACTGT 43
LLAP12_flhF_Prom   -----GGAATA--TTGCTCT-----TAAGTTT-AAAGA 25
Lmic_flhF_Prom     CATTGCTTGACGCAGCTTGCTGCTCAGCAGCAGGCAAAA-----CAAGATTAGCGGT 53
Lhack_flhF_Prom    -----CGTTAGTTCAGCTGGCAGCTCAGCAGCAGGCCAAA-----CAAGAATTGGCAGT 49
Lboze_flhF_Prom    -----ATTCTGATAATAAGCAGATAAGAATAGTAGGTACAGTAGG 41
Lgorm_flhF_Prom    -----GTGCGTAATA--TATCTCAT--GACTTTCATGTTTTGTCTG 37
Llyti_flhF_Prom    -----GATG--TGGCTCGA-----TGTTTTT-GTTGG 24
                    *          *

```

```

LpC_flhF_Prom      TTTGGTAGTTCAACCAAGTATAC-----GAACGGTT--TTGGCACGATT----TGTCG 72
LpP_flhF_Prom      TTTGGTAGTTCAACCAAGTATAC-----GAACGGTT--TTGGCACGATT----TGTCG 72
LpL_flhF_Prom      TTTGGTAGTTCAACCAAGTATAC-----GAACGGTT--TTGGCACGATT----TGTCG 72
LpPhil_flhF_Prom   TTTGGTAGTTCAACCAAGTATAC-----GAACGGTT--TTGGCACGATT----TGTCG 93
LpAlc_flhF_Prom    TTTGGTAGTTCAACCAAGTATAC-----GAACGGTT--TTGGCACGATT----TGTCG 72
LpTogus_flhF_Prom  TTTGGTAGTTCAACCAAGTATAC-----GAACGGTT--TTGGCACGATT----TGTCG 72
LLAP10_flhF_Prom   TTTAGTAGTACAACCTGGAATAA-----GGTCTGTT--TTGGCACGATT----TGTCG 91
LLAP12_flhF_Prom   CTTAGAACTGTAGTTTTCATAAAGTATTGGAATAAATCTTGCT----TA--GGTCCAC 79
Lmic_flhF_Prom     ATTAGTGTGTAACCAAGTATAC-----GAACGGTT--TTGGCACGTTT----TGTCG 101
Lhack_flhF_Prom    TTTAGTTGTGCAACCTGGGATAC-----GATCGGTT--TTGGCACGTTT----TGTCG 97
Lboze_flhF_Prom    AT--AGAA-GTAACTGAGGGTATCAC--AGTGGATTAGCAAGC----TAG-G-TGTGA 90
Lgorm_flhF_Prom    ATCAGGAG-ATTCTGTATAATAAACA--AATAAGAATAGTAGGCACAGTAG-GATAAAAA 93
Llyti_flhF_Prom    GCTATGAGCCTAACCTACAA-----AGAATAACTCTTAACCT----TAATGGTAATAA 72
                    *          *          *

```

```

LpC_flhF_Prom      TACAATATCCAATGACTTTTCATGTTTTG---TCTTATCAGGAAATACCTGATAACAAACA 129
LpP_flhF_Prom      TACTATATCTAGTGACTTTTCATGTTTTG---TCTTATCAGGAAATACCTGATAACAAACA 129
LpL_flhF_Prom      TACTATATCCAGTGACTTTTCATGTGTTG---TCTTATCAGGAAATACCTGATAATAAACA 129
LpPhil_flhF_Prom   TACAATATCCAATGACTTTTCATGTTTTG---TCTTATCAGGAAATACCTGATAACAAACA 150
LpAlc_flhF_Prom    TACAATATCCAATGACTTTTCATGTTTTG---TCTTATCAGGAAATACCTGATAACAAACA 129
LpTogus_flhF_Prom  TACTATATCCAATGACTTTTCATGTTTTG---TCTTATCAGGAAATACCTGATAACAAACA 129
LLAP10_flhF_Prom   TAATATATCCAGTGACTTCCATGTTTTG---TCCTATCAGGAAATTCCTGATAATAAACA 148
LLAP12_flhF_Prom   GAATAAATCGTGAGACGTA-GGGACATG-GGTTTTACAG-TAAA--AGCAATATGAATT 134
Lmic_flhF_Prom     TAATATTTCCAGTAACCTACATGTTTTA---TCGTATCAGGAAATTCCTGATAACAAACG 158
Lhack_flhF_Prom    TAATATTTCAAGTAACCTACAGTTTTG---TCTTACCAGGAAATTCCTGATAACAAACA 154
Lboze_flhF_Prom    TGTAGAGCCTAGAG-CTAA-ACTTCTCA--GTTTTCTG-CAAGCAAGCTACAATTTCTA 145
Lgorm_flhF_Prom    TGAATAAATGAGGG-C-AA-ACCTTCTCA--GTTTTCTTA-CAAGCAAGCTACAATTTCT- 146
Llyti_flhF_Prom    GGTTAGGTAAAGGGG-C-TG-ACTTTTTGCGATTTTTTCAGGTAAAT-AGTTGTTTTATATA 129
                    *          *          *          *

```

LpC_flhF_Prom	AATAA---GAATAATTG-----GAAGTGTAGGTTAGTTTTTGGGGTTGCATAGG	175
LpP_flhF_Prom	AATAA---GAATAATTG-----GAAGTGTAGGTTAGTTTTTGGGGTTGCATAGG	175
LpL_flhF_Prom	AATAA---GAATAATTG-----GAAGTGTAGGTTAGTTTTTGGGGTTGCATAGG	175
LpPhil_flhF_Prom	AATAA---GAATAATTG-----GAAGTGTAGGTTAGTTTTTGGGGTTGCATAGG	196
LpAlc_flhF_Prom	AATAA---GAATAATTG-----GAAGTGTAGGTTAGTTTTTGGGGTTGCATAGG	175
LpTogus_flhF_Prom	AATAA---GAATAATTG-----GAAGTGTAGGTTAGTTTTTGGGGTTGCATAGG	175
LLAP10_flhF_Prom	AATAA---GAATAATTG-----GTACTGTGGGATAGTCACACTCGTTAC--GAG	192
LLAP12_flhF_Prom	TAAAA-CGGAAATGGTACTTAG----AGCAATTTTCTTTATGTACCCGTCATAAGCAGG	188
Lmic_flhF_Prom	AATAA---GGATTATTG-----GTACAGTAGGATA-----GATG---GAG	192
Lhack_flhF_Prom	AATAC---GGATTATTG-----GAACAGTTGGTTAATTAA---GGTG---GAG	193
Lboze_flhF_Prom	TAAA---GAGGCATTGCGTGA-----ATAGTGACAAAT-----TTCTTCATAAGCAGG	190
Lgorm_flhF_Prom	-AAA---GAGGCATTGCGTGA-----ATAGTGACAAAT-----TTCTTCATAAGCAGG	190
Llyti_flhF_Prom	AAAAACGGAAGTAGTACTTAATTTTAATATTGACGATTGGGTACGCGTCATA-GCAGG	188
	* * * * *	

LpC_flhF_Prom	TGTGTTGAAGGCAGGAGGCATTATG	200
LpP_flhF_Prom	TGTGTTGAAGGCAGGAGGCATTATG	200
LpL_flhF_Prom	TGTATTGAAGGCAGGAGGCATTATG	200
LpPhil_flhF_Prom	TGTG-----	200
LpAlc_flhF_Prom	TGTGTTGAAGGCAGGAGGCATTATG	200
LpTogus_flhF_Prom	TGTATTGAAGGCAGGAGGCATTATG	200
LLAP10_flhF_Prom	TATA-----AATG	200
LLAP12_flhF_Prom	GGGA-----GCTTTATG	200
Lmic_flhF_Prom	TTTC-----TATG	200
Lhack_flhF_Prom	GCT-----TATG	200
Lboze_flhF_Prom	AGG-----CTTTATG	200
Lgorm_flhF_Prom	AGG-----CTTTATG	200
Llyti_flhF_Prom	GGGA-----GCTTTATG	200

ClustalW-Alignment mit *fliA*-Promotorsequenzen von *Legionella*

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Transkriptionsstartpunkt für *fliA* bestimmt und eine mögliche σ^{70} (RpoD) Bindestelle mit einer -35, einer -10 Box (rosa) und einer A/T-reichen Region (unterstrichen) identifiziert (Kapitel 4.3.6). Aufgrund der großen Ähnlichkeiten der Konsensussequenzen ist auch eine Interaktion mit σ^S (RpoS) wahrscheinlich. Hier wurde eine putative -10 Box gefunden (Kasten).

LpC_fliA_Prom	-----	
LpP_fliA_Prom	-----	
LpL_fliA_Prom	-----	
LpPhil_fliA_Prom	-----AAAACATCCATAAATCAGTAAAAAACAAATCCTATTTTAATCGC	46
LpAlc_fliA_Prom	-----	
LpTogus_fliA_Prom	-----	
LLAP10_fliA_Prom	-----	
LLAP12_fliA_Prom	-----	
Lmic_fliA_Prom	-----TAATCTT	8
Lhack_fliA_Prom	-----GATTCGC	7
Lboze_fliA_Prom	AGTACCTTTTGATGAACACATACACAGGCAGTGAAATGCAAAGCCGGTATTAATTGC	60
Lgorm_fliA_Prom	AGTTCCTTTTGATGAACACATACACAGGCAGTGAAATGCAAACCCGCTTAATTGC	60
Llyti_fliA_Prom	-----TAAGCGGTAAAAATCAAAACCTGTACTAATGGC	36
Llong_fliA_Prom	GGTCCCATTTGATGAGCATATACATAGGCGGTAAAAATCAAAACCTGTATTAATTGC	60
Loak_fliA_Prom	-----TTTATCCGC	9

LpC_fliA_Prom	TTTGT---TAGATTACC---AAATT-CTAATAACTACAATCTGCTGTTATTG-	180
LpP_fliA_Prom	TTTGT---TAGATTACC---AAATT-CTAATAACTACAATCTGCTGTTATTG-	187
LpL_fliA_Prom	TTTGT---TAGATTACC---AAATT-CTAATAACTACAATCTGCTGTTATTG-	187
LpPhil_fliA_Prom	TAAATTA---TCGCTATACT-----	191
LpAlc_fliA_Prom	TTTGT---TAGATTACC---AAATT-CTAATAACTACAATCTGCTGTTATTG-	187
LpTogus_fliA_Prom	TTTGT---TAGATTACC---AAATT-CTAATAACTACAATCTGCTGTTATTG-	187
LLAP10_fliA_Prom	GTTGACTG---TATATTTTACT---TAATT-ATCAAT--TATCTTGCTGCTTCTTG	187
LLAP12_fliA_Prom	CATACTAAAGATAGAGTCTCT---TAAGTACTA-----GTTGTGA	187
Lmic_fliA_Prom	TACG-----ACGTTCCCTTGACAGGGGCTGAGTA-----CAGCGAA--	188
Lhack_fliA_Prom	TAAA-----AAATT-----AAGCGCTTAGC-----CGGAAAAGAC	188
Lboze_fliA_Prom	TAAAG-----	191
Lgorm_fliA_Prom	TAAAG-----	191
Llyti_fliA_Prom	TAAAG-----	190
Llong_fliA_Prom	TAAAG-----	191
Loak_fliA_Prom	TATA-----A-ATT-----GAATGAAT-----AAGAA--	183

Für den Promotorbereich von *flaA* war bereits eine Konsensussequenz für den alternativen σ^{28} (FliA) Faktor beschrieben (Heuner et al. 1995). Diese wurden auch in allen Stämmen hoch konserviert gefunden.

LpC_flmA_Prom	-----CGATCTTTC-TATTATTTAACAC---CCTAATTT----	TATTCAATAAATTTT	45
LpP_flmA_Prom	----TGTCGATCTTTC-TATGTATTTAACAC---CCTAATTT----	TATTCAATAAATTTT	48
LpL_flmA_Prom	-----AATCGATCTTTC-TATTATTTTAACAC---TCTAATTT----	TATTCAATAAATTTT	48
LpPhil_flaA_Prom	-----AATCGATCTTTC-TATTATTTTAACAT---ACTAATTT----	TATTCAATAAATTTT	48
LpAlc_flaA_Prom	----AATCGATCTTTC-TATTATTTTAACAC---CCTAATTT----	TATTCAATAAATTTT	48
LpTogus_flaA_Prom	----AATCGATCTTTC-TATTATTTTAACAT---ACTAATTT----	TATTCAATAAATTTT	48
LLAP10_flaA_Prom	TTTTAATCCATACATGCACCTTTTATATAACAC---AATGATTC----	TACTAAATCAATTTT	53
LLAP12_flaA_Prom	-----AA-----AAGCAACAT---	ATTAATTT-----TATTAATCATTTTTT	34
Lmic_flaA_Prom	-----TAAAT-TAA---ATTTAATTA AAAATTTGTACATTTTGATATAACATTCGGCTTT		50
Lhack_flaA_Prom	-----TAAATGTTT-----ATTTAATTAACA---ATGCAATTC-----	CTTGCATTTTTT	41
Lboze_flaA_Prom	-----AACAGAGTGCTC-AAAAAATACAACC---ATTAATTT----	TATTAAATAAAAAT	48
Lgorm_flaA_Prom	-----ACAAATTGCCGC-AAAAAATACAACAC---TTTCATTT----	TAATGAAAAAATCC	47
Llyti_flaA_Prom	-----AAAGAGCAC---CAACGCAACAT---ATTCATTT----	TATTAATCATTTTTT	42
	* * ** **		

LpC_flalA_Prom	T-TGCGACTTTTC-----AAAAAAG-CAC--TTTCGGAAC	TAAA	GTTTTTTTC-ACTATT	95
LpP_flalA_Prom	T-TGCGATTTTTC-----AAAAAAG-CGC--TTTTCGGAAC	TAAA	GTTTTTTTC-ACTATT	98
LpL_flalA_Prom	T-TGCGACTTTTTC-----AAAAAAG-CGC--TTTCGGAAC	TAAA	GTTTTTTTC-ACTATT	98
LpPhil_flalA_Prom	T-TGCAACTTTTTC-----AAAAAAG-CGC--TTTCGGAAC	TAAA	GTTTTTTTC-ACTATT	98
LpAlc_flalA_Prom	T-TGCGACTTTTTC-----AAAAAAG-CAC--TTTCGGAAC	TAAA	GTTTTTTTC-ACTATT	98
LpTogus_flalA_Prom	T-TGCAACTTTTTC-----AAAAAAG-CGC--TTTCGGAAC	TAAA	GTTTTTTTC-ACTATT	98
LLAP10_flalA_Prom	T-ATCTTTTTC-----AAAAAAACGC--TTAAAGCCC	TAAA	GTTTTTTTCCACT-TT	104
LLAP12_flalA_Prom	TTATTTATTTTTC-----AAAAAAATTT-TGTTTGTCC	TAAA	GTTTTTTTGC-AAATTA	86
Lmic_flalA_Prom	T-ATTCATTTTTC-TAGAGAAATGAC-GTTGAGC-	TAAA	GTTTTTTTCCT-CTTTT	103
Lhack_flalA_Prom	T-ATTCCTTCTTTTGTGTAATAATCGA-GTGAACAC	TAAA	GTTTTTTTA-TATATT	97
Lboze_flalA_Prom	T-CCCTTTTTC-----AAAAAAACAG-GTGTGAGCC	TAAA	GTTTTTTTGC-CATATG	99
Lgorm_flalA_Prom	T-CTCATTTTTC-----AAAAAAGCAT-GCACAAC	TAAA	GTTTTTTCG-AGTTCA	98
Llyti_flalA_Prom	---TTATTTTTC-----TAAAAAATTCCTATTTTTTTC	TAAA	GTTTTTTTAC-ATCATC	93
	* * *	* * *	*****	

LpC_flaA_Prom	TCCGATAA CTAAATCGGGTACAGTAAATTC-ACAACAATAAATCGAATTTACTGA----	150
LpP_flaA_Prom	TCCGATAA CTAAATCGGGTACAGTAAATTC-ACAACAATAAATCGAATTTACTGA----	153
LpL_flaA_Prom	TCCGATAA CTAAATCGGGTACAGTAAATTC-ACAACAATAAATCGAATTTACTGA----	153
LpPhl1_flaA_Prom	TCCGATAA CTAAATCGGGTACAGTAAATTC-ACAACAATAAATCGAATTTACTGA----	153
LpA1c_flaA_Prom	TCCGATAA CTAAATCGGGTACAGTAAATTC-ACAACAATAAATCGAATTTACTGA----	153
LpTogus_flaA_Prom	TCCGATAA CTAAATCGGGTACAGTAAATTC-ACAACAATAAATCGAATTTACTGA----	153
LLAP10_flaA_Prom	TCCGATAA CTTCATTGGGTAGGTGTAATTC-ATT-CAAAA---GAATTTACCTA----	153
LLAP12_flaA_Prom	ACCGATAA CTGCATTTGGGTACGGGAAACAC-ACGAT-ATAAAGTAGTGACTTGGCTTAA	144
Lmic_flaA_Prom	ACCGATAA CTCTCTCGGGTTCGCGATAAATTT-ACAA-----GA--TAATTTATCGATA--	153
Lhack_flaA_Prom	TTTCGATAA AAGCGATGGGTTTCGATAAATTTTACAATAATTA--GAATTTATCGAGG--	153
Lboze_flaA_Prom	TCCGATAA CCCTTTTTCGTCACGTTGTAATTT-GCTTTTAAAAA--GGAATTTGCCAAT----	153
Lgorm_flaA_Prom	TCCGATAA CTTTTATGCGTACGGTAAATTC-GCCATTAAAAATGGAATTTACCAAT---	153
Llyti_flaA_Prom	GCCGATAA ACATTTTGGGAACAGGAAGCTC-ATATT-A-AAAATGAATTTCTTGATT--	148
	***** * ** *	

LpC_flmA_Prom	TTACA-----AATGTCCCATACC--AGGGATTCAGGTCT	GAGGAGACTAAAATATG	200
LpP_flmA_Prom	TTACA-----AATGTCCCATACC--AGGGATTCAGGTCT	GAGGAGACTAAAATATG	203
LpL_flmA_Prom	TTACA-----AATGTCCCATACC--AGGGATTCAGGTCT	GAGGAGACTAAAATATG	203
LpPhil_flmA_Prom	TTACA-----AATGTCCCATACC--AGGGATTCAGGTCT	GAGGAGACTAAAATATG	203
LpAlc_flmA_Prom	TTACA-----AATGTCCCATACC--AGGGATTCAGGTCT	GAGGAGACTAAAATATG	203
LpTogus_flmA_Prom	TTACA-----AATGTCCCATACC--AGGGATTCAGGTCT	GAGGAGACTAAAATATG	203
LLAP10_flmA_Prom	CTT-----AATGTCCCAAACC--AGGGATTCAGGTCT	GAGGAGACTAAAATATG	203
LLAP12_flmA_Prom	TTAAACATAGAAAAAATCCCAAACC--AGGGAT-CAGGTCT	GAGGAGACTATAA-TATG	200
Lmic_flmA_Prom	TAAGG-----TAAATCCCAATCTCAGGGATTGAGTC-	GAGGAGAATTCAGT-ATG	203
Lhack_flmA_Prom	TAAGG-----TAAATCCCATATC-CAGGGATTCAGGTT-	GAGGAGATTTAGCCATG	203
Lboze_flmA_Prom	TTACA-----AATGTCCCAAACC--AGGGATTAGGTCT	GAGGAGACTATAACTATG	203
Lgorm_flmA_Prom	TTACA-----AATGTCCCAAACC--AGGGATTAGGTCT	GAGGAGACTATAACTATG	203
Llyti_flmA_Prom	CTAAACGGA-AATAAAATCCCAAAC--AGGGAT-CAAGTCT	GAGGAGACTATAAATATG	203
	* * * * *	* * * * *	

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
α	anti
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACES	N-(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium-Persulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CFU	Colony forming units, Kolonie bildende Einheiten
Cm	Chloramphenicol
CO ₂	Kohlendioxid
CsrA	carbon storage regulator A
DFA	Direct fluorescent antibody testing

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dot/ icm	defect in organelle trafficking/ intracellular replication
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
ELDS-NET	<u>E</u> uropean <u>L</u> egionaires' <u>D</u> isease <u>S</u> urveillance-Network
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera, und Andere
EtOH	Ethanol
EWGLI-NET	European Working Group for Legionella Infections
F	Farad
$\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$	Eisen(III)-pyrophosphat
Fe_4NO_3	Eisen(III)-nitrat
g	Gramm
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung
h	hour(s), Stunde(n)
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	destilliertes Wasser
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	bidestilliertes Wasser
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	kilo
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton

Km	Kanamycin
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	Luria Bertani
LCV	<i>Legionella</i> containing vacuole
M	Molar
mA	Milliampere
MIF	mature intracellular form
min	Minute(n)
Mip	macrophage infectivity potentiator
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity of infection, Verhältnis Bakterien zu Amöben
MOMP	Major outer membrane protein
mRNA	messenger RNA
MspA	Major secretory protein A, kodiert durch <i>proA</i>
n	nano
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat-5-hydrat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
nm	nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-chain-reaction
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
PHB	Polyhydroxybutyrat
PK	Primerkombination
r	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transcription
SBT	sequence-based typing
SD	Standardabweichung, standard derivation
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
Sec	general secretory pathway
Sg	Serogruppe
σ	sigma
ssp.	Subspezies
T1SS	Typ I Sekretionssystem
T2SS	Typ II Sekretionssystem
T3SS	Typ III Sekretionssystem
T4ASS	Typ IVA Sekretionssystem
T4BSS	Typ IVB Sekretionssystem
T5SS	Typ V Sekretionssystem
T6SS	Typ VI Sekretionssystem

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tat	twin-arginine translocation
TBS	Tris Buffered Saline
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxylmethhylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ÜN-Kultur	Übernachtskultur
V	Volt
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YEB	Buffered Yeast Extract
z. B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Ω	Ohm

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Drs. h.c. Jörg Hacker möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Molekulare Infektionsbiologie in Würzburg und die Möglichkeit des Umzugs nach Berlin an das Robert Koch-Institut danken.

Herrn PD Dr. Klaus Heuner danke ich für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft, den wissenschaftlichen Freiraum, das angenehme Arbeitsklima und die Geduld in dieser langen Zeit. Diese Arbeit entstand aus einem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekt von PD Dr. Klaus Heuner.

Frau Prof. Dr. Carmen Buchrieser vom Institut Pasteur in Paris danke ich für die bereitgestellten Genom-Daten verschiedener *Legionella* Stämme.

Gudrun Holland von der Arbeitsgruppe ZBS4 des Robert-Koch-Instituts möchte ich für die Zusammenarbeit und die vielen elektronenmikroskopischen Bilder danken.

Den Kollegen vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie und des Zentrums für Infektionsforschung in Würzburg danke ich für ihre große Kollegialität während und nach der Arbeit. Ihr habt den Wechsel nach Berlin sehr schwer gemacht.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern der ehemaligen Arbeitsgruppe P26 und neuen Arbeitsgruppe ZBS2 am Robert Koch-Institut für die Hilfsbereitschaft und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken: Vroni Herrmann, Monika Lautner, Dr. Eva Schunder, Yvonne Matern, Nicole Janitzek, David Wagner, Dr. Susanne Behrens-Kneip. Ganz großen Dank an Kerstin Rydzewski, die immer für frische Zellen im Brutschrank und heißen Kaffee im Büro gesorgt hat.

Meine Eltern und Großeltern danke ich für die finanzielle Unterstützung in dieser Zeit. Ich danke meinen Freunden aus Parchim, Würzburg und Berlin für die tolle Zeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Lebenspartnerin Eva Schunder, die mich immer unterstützt, mein „Leiden“ ertragen und oft genug für den richtigen Schwung gesorgt hat. Meiner Tochter Luna danke ich für die „Übernahme“ der Freizeitgestaltung und das Lächeln vor und nach der Arbeit.

Erklärung

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Humboldt-Universität zu Berlin (2005) erkläre ich hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, 2012

Tino Schulz